



UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA, ANATOMÍA Y BIOLOGÍA CELULAR

**INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA "RAMÓN DE LA
FUENTE M."**

**SUBDIRECCIÓN DE INVESTIGACIONES CLÍNICAS
DEPARTAMENTO DE NEUROFARMACOLOGÍA. MÉXICO.D.F.**

**PARTICIPACIÓN DE LA MELATONINA EN LA ORGANIZACIÓN
DE MICROFILAMENTOS Y MICROTÚBULOS: IMPLICACIONES
EN LA MEMORIA ESPACIAL DE LA RATA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**DOCTORA EN NEUROCIENCIA Y BIOLOGÍA DEL
COMPORTAMIENTO**

P R E S E N T A

GRACIELA JIMÉNEZ RUBIO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. GLORIA BENÍTEZ KING

TUTOR: DR. JOSÉ MARÍA DELGADO GARCÍA

SEVILLA, ESPAÑA



INSTITUTO NACIONAL DE PSIQUIATRÍA
RAMÓN DE LA FUENTE MÚNIZ



SALUD

Dra. Gloria Benítez King, Jefe del Departamento de Neurofarmacología de la Subdirección de Investigaciones Clínicas del Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente M."

CERTIFICA:

Que el trabajo de tesis titulado "PARTICIPACIÓN DE LA MELATONINA EN LA ORGANIZACIÓN DE MICROFILAMENTOS Y MICROTÚBULOS: IMPLICACIONES EN LA MEMORIA ESPACIAL DE LA RATA" fue realizado por Graciela Jiménez Rubio, Licenciada en Psicología por la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección y supervisión de la Dra. Gloria Benítez King, quién considera que tanto el trabajo experimental, como el escrito reúnen las condiciones de calidad y rigor científico para ser presentados y defendidos como Tesis

México, D.F. 31 de Octubre de 2012


Dra. Gloria Benítez King

DEDICATORIAS

A mi hija, Aylín Sindari Bonilla Jiménez:

Porque es mi principal motivación. Por su paciencia, su cariño, sus consejos (que fueron muchos) y porque su independencia y responsabilidad me dejó realizar este trabajo.

A mi esposo, Antonio Bonilla Pérez:

Porque siempre le ha dado prioridad a mi trabajo. Porque su cariño y apoyo me permitió dedicarme a la realización de este proyecto.

A mis padres, María Rubio Sánchez y Jorge Jiménez Rojas:

No sólo por darme la vida, sino porque me enseñaron que la dedicación y la perseverancia me permitirían lograr mis metas.

AGRADECIMIENTOS

A mis hermanas y hermano; Liliana, Georgina, Martha, Rosa María, Eduardo, Susana, Alicia, María de Lourdes, Ofelia, Alejandra, María del Rosario, Judith y Gloria:

Siempre que las he necesitado han estado allí y son mi ejemplo de trabajo, responsabilidad y logros.

A la Dra. Gloria Benítez King:

Por transmitirme su conocimiento y enseñarme que la ciencia requiere dedicación y entrega.

Al Dr. José María Delgado García:

Por aceptarme en este programa que representó para mí no sólo conocimiento científico y académico sino también conocimiento de otras maravillosas culturas.

Al Dr. Carlos Berlanga Cisneros:

Por brindarme su apoyo para concretar este proyecto.

Al M. en C. Francisco Javier García Vázquez:

Por su asesoría para la realización de la técnica de inmunohistoquímica y por permitirme llevar a cabo estos experimentos en el laboratorio de Patología Molecular del Departamento de Anatomía Patológica en el Instituto Nacional de Pediatría.

A la Dra. Sagrario Ahedo Monroy:

Por escucharme y ayudarme a reconocer el camino que me llevaría a lograr mis objetivos.

A Leonardo Ortíz López:

Por su colaboración y enseñanza de las técnicas experimentales de este proyecto.

A Patricia Chimal Cortés:

Por su excelente apoyo técnico en la realización de los experimentos y por brindarme su amistad.

Al biólogo Héctor Solís Chagoyán, M. en C. Marcela Valdés Tovar y M. en C. Aline Domínguez Alonso:

Por la revisión y comentarios efectuados durante la realización de los experimentos de este proyecto.

A Martha Varela Miranda:

Por su apoyo en los procedimientos administrativos.

A Bernardo Antonio Quintero Noveron y Wenceslao Serrano Vicuña:

Por su excelente asistencia y realización de técnicas de informática durante el proyecto.

A Raúl Cardoso Gutiérrez y José Luis Calderón Cardoso:

Por la colaboración en la realización de las figuras.

ÍNDICE

I. Resumen.....	1
II. Introducción.....	3
II.1. La enfermedad de alzheimer.....	3
II.1.1. Deterioro en la cognición.....	11
II.1.2. Alteración de los ritmos circadianos.....	13
II.1.3. Disminución de niveles de melatonina.....	14
II.2. Melatonina.....	16
II.2.1. Melatonina y sincronización de los ritmos circadianos.....	21
II.2.2. Papel sincronizador de la melatonina en el citoesqueleto.....	23
II.2.3. Melatonina y memoria.....	29
II.2.3.1. El hipocampo y la integración de la memoria.....	31
II.3. Utilidad de la melatonina en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.....	37
III. Hipótesis.....	44
IV. Objetivo General.....	44

V. Objetivos particulares	45
VI. Metodología	46
VI.1. Animales	46
VI.1.1. Pinealectomía	47
VI.2. Determinación de los niveles en suero de melatonina mediante la técnica ELISA	49
VI.3. Separación de las fracciones citosólica y citoesqueleto membranaral	50
VI.4. Determinación de actina por el método de ELISA	51
VI.5. Determinación de tubulina por <i>Western Blot</i> ..	53
VI.5.1. Preparación de los geles	53
VI.5.2. Separación de proteínas por electroforesis	54
VI.5.3. Inmunodetección de la proteína tubulina beta	55
VI.6. Inmunohistoquímica: Distribución de tubulina beta en el hipocampo	56
VI.7. Evaluación de la memoria en el laberinto radial de 8 brazos	60
VI.8. Análisis Estadístico	62
VII. Resultados	63
VII.1. Determinación de los niveles de la melatonina en el suero	63

VII.2.	Relación de tubulina y actina polimerizada/despolimerizada.....	64
VII.3.	Localización de la tubulina beta en el hipocampo.....	75
VII.4.	Cambios en la memoria espacial en el laberinto radial de 8 brazos.....	76
VII.4.1.	Errores en la memoria de trabajo espacial.....	77
VII.4.2.	Tiempo para completar la tarea en el laberinto radial de 8 brazos.....	80
VIII.	Discusión	85
IX.	Conclusiones	96
X.	Bibliografía	98
ANEXO.		

I. RESUMEN

La glándula pineal sintetiza la melatonina, la cual tiene un perfil de secreción circadiano bien definido y alcanza sus niveles más altos durante la fase de oscuridad. Una de las principales funciones de esta indolamina es sincronizar los ritmos circadianos con el fotoperiodo. Sin embargo, en la enfermedad de Alzheimer se observan alteraciones circadianas y un decremento en los niveles de esta hormona durante la noche, por lo que se ha propuesto que estas alteraciones participan en la patogénesis de esta enfermedad. En esta patología también ocurre una organización anormal del citoesqueleto, lo cual provoca la pérdida de la polarización neuronal y disrupción de la conectividad sináptica. Además, y posiblemente relacionado con lo anterior, estos pacientes presentan un deterioro en la memoria y en el aprendizaje.

Con el objetivo de investigar el efecto de la melatonina en el citoesqueleto y en la memoria, se analizaron los cambios en los microfilamentos y los microtúbulos, así como en la memoria espacial, en animales pinealectomizados después de la administración de esta hormona (1 mg/kg) durante 7 días. Se determinaron las modificaciones en el hipocampo de actina y de tubulina en la fracción citoesqueleto-membranal como índice de la organización de los microfilamentos y los

microtúbulos mediante la técnica de ELISA y *Western Blot*, respectivamente; además, se evaluó la memoria espacial en el laberinto radial de 8 brazos.

Los resultados mostraron un incremento en la relación de actina polimerizada/despolimerizada (74%) en el hipocampo de ratas sacrificadas en la fase de oscuridad y en los niveles de esta indolamina (98%). Asimismo, ocurrió un decremento en la relación polimerización/despolimerización de actina y tubulina (41%) en ratas pinealectomizadas. En contraste, el tratamiento con melatonina restableció parcialmente las proporciones de actina y tubulina organizadas en microfilamentos y microtúbulos, respectivamente.

Por otro lado, se observó un incremento en los errores en la memoria de trabajo espacial en animales pinealectomizados (235%), mientras que el tratamiento posterior con la hormona mejoró este déficit de memoria (42%). Del mismo modo, el tiempo para completar la tarea en el laberinto radial de 8 brazos fue mayor en los animales pinealectomizados (20%) en comparación con los animales a los cuales se les extrajo la glándula pineal y se les administró la indolamina. Los resultados muestran que la deficiencia en los niveles de la melatonina produce desorganización del citoesqueleto en el hipocampo y alteraciones en la memoria espacial.

II. INTRODUCCIÓN

II.1. La enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer es la causa más común de demencia. Representa entre 50% y 80% de todas las demencias y se define por una declinación progresiva de la cognición (Knopman, 2003). Los criterios diagnósticos requieren que dos o más dominios cognitivos estén afectados: debe haber deterioro de la memoria y al menos uno de lenguaje, función visoespacial, función ejecutiva (inclusive razonamiento abstracto y concentración) y praxis (habilidad para ejecutar actividades motoras en la ausencia de debilidad -DSM-IV-).

Los pacientes con enfermedad de Alzheimer presentan una extensa atrofia cerebral (Geula y Mesulam, 1989). Los pliegues de la capa externa cerebral (giros) se encogen, los surcos se ensanchan y los ventrículos se alargan notablemente. La masa cerebral se reduce a una tercera parte, por una pérdida significativa de células nerviosas, sinapsis y dendritas. En comparación, un cerebro sano sufre sólo una pérdida modesta de masa durante el envejecimiento (Geula y Mesulam, 1989; figura 1).

En el cerebro de estos pacientes la corteza entorrinal es una de las primeras áreas que muestra anormalidades. Esto se relaciona con la pérdida de memoria, uno de los primeros síntomas en la enfermedad de Alzheimer. El hipocampo también presenta un daño extremo, y en la autopsia se observa que esta estructura pierde

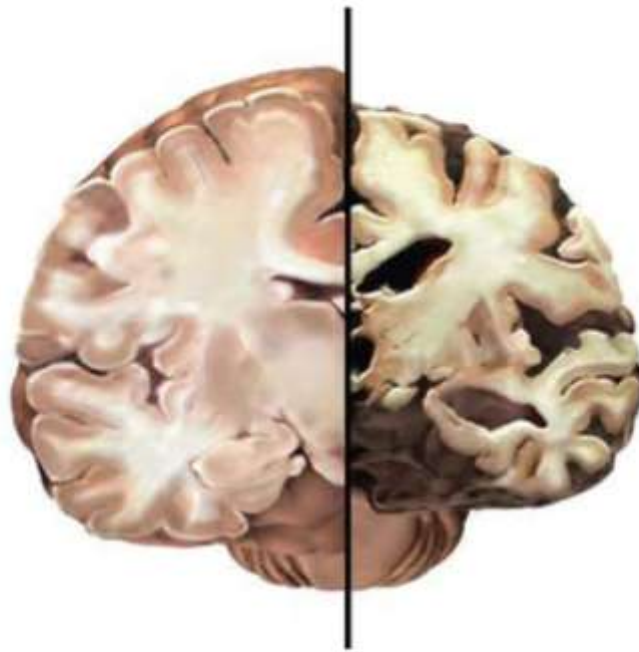


Figura 1. El cerebro de un sujeto sano (izquierda) y de un paciente con enfermedad de Alzheimer (derecha). Tomado de: La asociación de Alzheimer 2007. Ilustración: Stacy Jannis.

virtualmente todas las células del área CA1, crucial para la formación de la memoria (Geula y Mesulam, 1989).

La enfermedad de Alzheimer se diagnostica *post mortem* por la cuantificación de placas seniles en el área del hipocampo. Éstas están compuestas por depósitos extracelulares del péptido A β -amiloide y ovillos

neurofibrilares constituidos por la proteína tau, localizados en el citoplasma de las neuronas del lóbulo temporal medial y en áreas corticales cerebrales (Braak y Braak, 1991; figura 2).

En 1906, Alois Alzheimer descubrió dos tipos de lesiones en los pacientes con demencia: ovillos

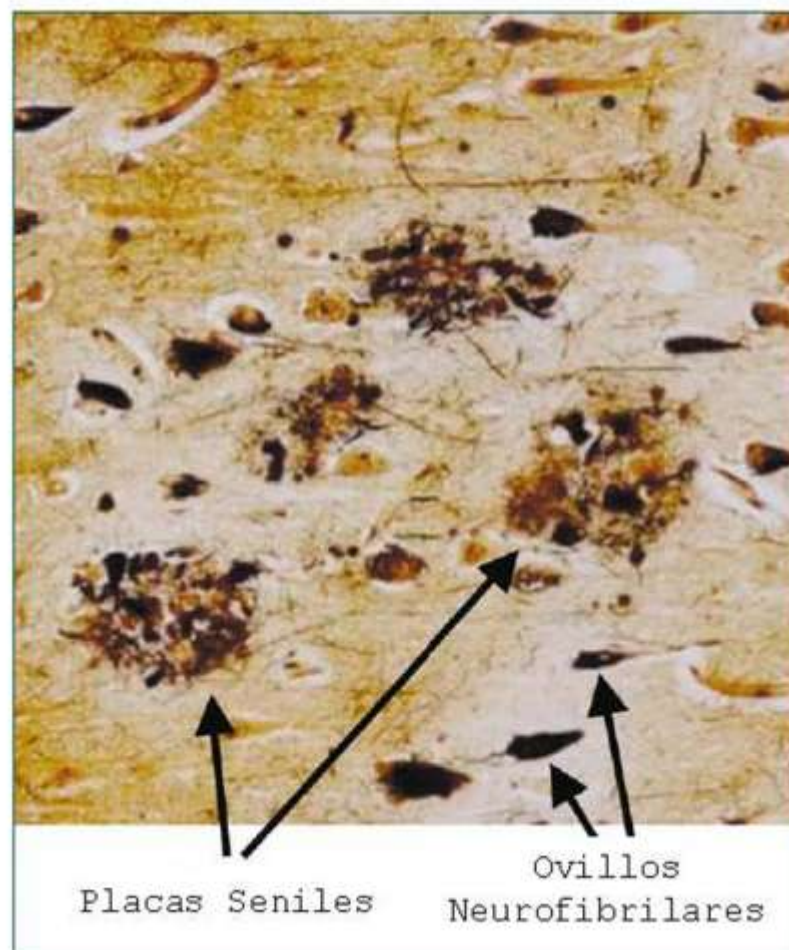


Figura 2. Placas seniles y ovillos neurofibrilares en la corteza cerebral de pacientes con enfermedad de Alzheimer. Las placas son depósitos extracelulares de beta amiloide rodeadas por neuritas distróficas, astrocitos reactivos y microglía, mientras que los ovillos son agregados intracelulares compuestos de una forma hiperfosforilada de la proteína tau asociada a los microtúbulos. Tomada de Blenow et al., 2006

intracelulares y placas en los espacios extracelulares, cerca de las neuronas en degeneración (Alzheimer, 1907). A mediados de 1980, Glenner y Wong (1984) descubrieron que las placas estaban compuestas del péptido β -amiloide, polipéptido de 39 a 42 aminoácidos. Después de este descubrimiento, varios hallazgos mostraron la importancia de los eventos fisiológicos relacionados con las placas. El primero fue el descubrimiento de Hardy y Higgins sobre las mutaciones en la proteína precursora β -amiloide, que generó la hipótesis de la cascada amiloide en 1992 (Hardy y Higgins, 1992). Esta teoría implica que la disfunción neuronal se genera por toxicidad amiloide. Más adelante, esta hipótesis se confirmó con la clonación de las proteínas presenilina (Sherrington *et al.*, 1995; Levy-Lahad *et al.*, 1995) y la demostración de que las mutaciones que causan el Alzheimer en la presenilina 1 y presenilina 2 también incrementan el procesamiento de la proteína precursora β -amiloide (Scheuner *et al.*, 1996).

Por otra parte, Iqbal y Grundke-Iqbal propusieron la "hipótesis de tau" en 1986. Ésta implica que la hiperfosforilación anormal de tau en la enfermedad de Alzheimer provoca la pérdida de las funciones de tau normal; la tau hiperfosforilada secuestra a la tau y a las isoformas 1 y 2 de las MAP, lo cual afecta la estructura de los microtúbulos e inhibe el flujo axoplásmico que provoca la neurodegeneración retrógrada,

y la pérdida de sinapsis y de cognición en pacientes con demencia tipo Alzheimer.

La proteína tau pertenece a la familia de las proteínas asociadas a los microtúbulos (MAP). En el ser humano, se distribuyen sobre todo en las neuronas (Schoenfeld y Obar, 1994; Tucker, 1990), aunque las células no neuronales tienen pequeñas cantidades. El gen de tau está constituido por más de 100 kb, se localiza en el brazo largo del cromosoma 17, en la posición 17q21 (Neve *et al.*, 1986), y contiene 16 exones (Andreadis *et al.*, 1995). En el cerebro existen 6 isoformas, formadas por 352 a 441 aminoácidos. Su peso molecular está en el rango de 45 a 65 kDa. Las isoformas de tau difieren entre sí por la presencia de tres (3R) o cuatro regiones repetidas (4R) en la parte carboxi-terminal (C-terminal) de la molécula y por la ausencia o presencia de uno o dos insertos (29 o 58 aminoácidos) en la parte amino-terminal (N-terminal) (Goedert 1989a, b; Himmler *et al.*, 1989).

Las proteínas tau se unen a los microtúbulos mediante cuatro dominios repetidos en su extremo C-terminal. Los dominios (R1-R4) se codifican por los exones 9-12 (Lee *et al.*, 1989). Una función de las proteínas tau es incrementar la tasa de polimerización de los microtúbulos e inhibir así la tasa de despolimerización (Drechsel *et al.*, 1992). Además, esta

proteína estabiliza los microtúbulos durante el transporte axonal y participa en el crecimiento de las neuritas (Stamer *et al.*, 2002; González-Billault *et al.*, 2002); cuando se fosforila, tiende a agregarse en filamentos, lo que induce la ruptura de las rutas microtubulares y después la muerte neuronal (Augustinack *et al.*, 2002). Por tanto, las proteínas tau fosforiladas son menos eficaces que las no fosforiladas para estimular la polimerización de los microtúbulos (Cleveland *et al.*, 1977a, b; Yamamoto *et al.*, 1988; Biernat *et al.*, 1993; Bramblett *et al.*, 1993; Drubin *et al.*, 1986; Lindwall y Cole, 1984).

La fosforilación y defosforilación de la proteína tau involucra cinasas y fosfatasas, respectivamente. Entre las cinasas que fosforilan a la proteína tau se encuentran la proteína cinasa activada por mitógeno, la cinasa tubulina-tau, las cinasas dependientes de ciclina (cdc2 y cdk5), la cinasa que regula la afinidad de los microtúbulos (MARK), la proteína cinasa II dependiente de calcio/calmodulina, la cinasa dependiente de AMP cíclico (PKA), la caseína cinasa I y II, y la cinasa glicógeno sintasa 3 (GSK3) (Drewes *et al.*, 1992; Goedert *et al.*, 1997; Reynolds *et al.*, 1997; Vulliet *et al.*, 1992; Takahashi *et al.*, 1995a, b; Baumann *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1995; Drewes *et al.*, 1997; Baudier y Cole, 1988; Steiner *et al.*, 1990; Jicha *et al.*, 1999; Litersky y

Johnson, 1992; Pierre y Nunez, 1983; Greenwood *et al.*, 1994; Planel *et al.*, 2002). Para contrabalancear la acción de las cinasas, las fosfatasas endógenas 1, 2A, 2B y 2C desfosforilan la proteína tau (Buee-Scherrer *et al.*, 1996; Sergeant *et al.*, 1995; Matsuo *et al.*, 1994; Soulie *et al.*, 1996).

Además de las placas seniles y los ovillos neurofibrilares observados en el cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer, se han descrito anormalidades en la organización de actina. Estos pacientes presentan inclusiones enriquecidas en actina-cofilina (Maloney *et al.*, 2007; Bernstein *et al.*, 2011). A menudo, éstas se organizan en manojos en forma de varas de filamentos (varas de actina-cofilina) y también como agregados irregulares (agresomas) o inclusiones intracelulares cristalinas con actina y proteínas que se unen a la actina (cuerpos Hirano). Las varas de actina-cofilina secuestran a la cofilina activa, necesaria para mantener la plasticidad de las espinas dendríticas. Por esta razón, la disfunción sináptica en el cerebro de pacientes con Alzheimer puede ser resultado de cambios en la regulación local de cofilina dentro de las espinas, además de la formación de varas de actina-cofilina que secuestran a la cofilina de las espinas y bloquean su transporte, o una combinación de ambos efectos (Bamburg y Bloom, 2009).

Si bien se han detectado cuerpos Hirano en múltiples áreas del cerebro, suelen presentarse en los cuernos de Ammon del hipocampo (Hirano *et al.*, 1968), donde se encuentran también los ovillos neurofibrilares (Hirano, 1994). Debido a que esta área cerebral participa en la memoria, la formación de la inclusión de los cuerpos Hirano en esta región puede contribuir al daño cognitivo propio de los pacientes con Alzheimer, así como de muchos trastornos neurodegenerativos (Hirano, 1994). Además, se ha demostrado una alteración en la organización de los filamentos de actina en neuronas cultivadas con la proteína beta amiloide fibrilar (Heredia *et al.*, 2006). La incubación con 20 μ M de esta proteína por 24 hr produce en neuronas en cultivo la formación y contorsión de las neuritas, el crecimiento aberrante de los procesos neuríticos en el soma así como una reducción de la estructura axonal. Esta distrofia se acompaña de una reorganización de los filamentos de actina. Esto se evidenció por una densa tinción de faloidina rodaminada en las neuritas distróficas cerca de los depósitos de beta amiloide fibrilar, lo que indica que la deposición se relaciona con una alteración en la organización de los filamentos de actina y la distrofia neuronal.

II.1.1.Deterioro de la cognición

Se ha establecido que los marcadores biológicos de la enfermedad de Alzheimer aparecen con años de anticipación a los síntomas cognitivos y conductuales. La patología de esta enfermedad es al principio selectiva para las regiones límbicas implicadas en la memoria episódica (memoria de eventos personales y sus relaciones espacio-temporales) (Braak y Braak, 1991; Jack *et al.*, 1997; De Toledo-Morrell *et al.*, 2000; Tulving, 1972). Después la patología progresa a otras regiones neocorticales (Braak y Braak 1996a, b; Braak *et al.*, 1999; Jack *et al.*, 2000), momento en el que emergen los síntomas cognitivos adicionales y se manifiesta el síndrome de la demencia.

Los pacientes con enfermedad de Alzheimer llevan a cabo de manera deficiente las pruebas de memoria episódica (libre recuerdo, reconocimiento, aprendizaje de pares asociados) en virtualmente todas las modalidades (auditiva, visual y olfativa) (Salmon, 2000). Las evidencias indican que este déficit se debe en gran parte a la consolidación o almacenamiento ineficaces de nueva información.

Además del detrimento en la memoria episódica, estos pacientes presentan deterioro de lenguaje y conocimiento semántico (conocimiento general de hechos y conceptos, y significado de las palabras); también manifiestan

dificultades en pruebas para nombrar objetos (Bayles y Tomoeda, 1983; Martin y Fedio, 1983; Bowles *et al.*, 1987; Hodges *et al.*, 1991), fluidez verbal (Martin y Fedio, 1983; Butters *et al.*, 1987; Monsch *et al.*, 1992) y categorización semántica (Aronoff *et al.*, 2006).

Por otro lado, al inicio de esta patología los sujetos presentan déficit en las funciones de ejecución, memoria de trabajo y atención. Estos pacientes presentan dificultades en las funciones de ejecución, responsables de la manipulación mental de información, formación de conceptos, resolución de problemas y conducta dirigida a un objetivo (Perry y Hodges, 1999; Chen *et al.*, 2001). Se observa que las alteraciones en las funciones de ejecución se asocian al incremento de ovillos neurofibrilares en la corteza prefrontal (Johnson *et al.*, 1999; Waltz *et al.*, 2004). En el caso del déficit en la memoria de trabajo, se relaciona un daño referente a la memoria inmediata (Baddeley *et al.*, 1991; Collette *et al.*, 1999). Además, los pacientes con enfermedad de Alzheimer con demencia moderada presentan un deterioro en las tareas de atención compleja o que requieren desconexión eficiente y cambio de atención (Parasuraman y Haxby, 1993; Perry y Hodges, 1999). En contraste, la habilidad para concentrarse y mantener la atención se ve afectada sólo en las últimas etapas de la enfermedad.

Asimismo, estos pacientes presentan déficit en habilidades visoespaciales (habilidad para percibir el espacio, y orientar y dirigir movimientos a través de él) en algún momento de la enfermedad (Cronin-Golomb y Amick, 2001). Los cambios en la función visoespacial son aparentes en tareas visuoconstruccionales y que requieren habilidades visuoperceptuales y orientación visual. El déficit visuoperceptual en estos sujetos puede deberse, en parte, a la pérdida de interacción eficaz entre sistemas de procesamiento de información distintos y relativamente intactos (Morrison *et al.*, 1991).

II.1.2.Alteración de los ritmos circadianos

Los pacientes con enfermedad de Alzheimer muestran alteraciones circadianas con una amplitud reducida y retraso de fase de la temperatura corporal y actividad locomotora (Satlin *et al.*, 1995; Van Someren *et al.*, 1996), así como alteraciones en el ciclo sueño-vigilia (Loewenstein *et al.*, 1982; Prinz *et al.*, 1982). Harper y colaboradores (2001) sugieren que los mecanismos patológicos de estas modificaciones en los ritmos circadianos pueden deberse a alteraciones celulares en el núcleo supraquiasmático. Al respecto, se ha observado un decremento del número de células y volumen de este núcleo cerebral (Swaab *et al.*, 1985). Se ha propuesto además que una degeneración central, no específica y generalizada

sea la responsable de estas alteraciones circadianas (Harper *et al.*, 2004).

Los cambios en la ritmicidad del ciclo sueño-vigilia abarcan un incremento de la actividad durante la noche, combinada con la aparición de siestas frecuentes durante el día y *sun downing* (tendencia a incrementar la actividad locomotora durante la tarde/noche) (Van Someren *et al.*, 1996; Witting *et al.*, 1990). Por añadidura, estos pacientes presentan alteraciones en la estructura del sueño, por ejemplo, disminución en el porcentaje del sueño de ondas lentas, incremento del porcentaje de la fase 1 del sueño, incremento en el porcentaje de la vigilia durante la noche (Bliwise *et al.*, 1989; Loewenstein *et al.*, 1982; Prinz *et al.*, 1982; Vitiello *et al.*, 1990; Reynolds *et al.*, 1985) y disminución del porcentaje del sueño MOR (Prinz *et al.*, 1982; Montplaisir *et al.*, 1995), así como periodos de sueño MOR más breves (Montplaisir *et al.*, 1995).

II.1.3. Disminución de niveles de melatonina

Las alteraciones circadianas en la enfermedad de Alzheimer se asocian a un decremento de los niveles de melatonina durante la noche, incremento durante el día y desorganización del ritmo circadiano de su secreción (Skene *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 1999; Mishima *et al.*,

1999; Ohashi *et al.*, 1999). Asimismo, se describe que sus niveles en el líquido cefalorraquídeo decrecientan conforme progresa la neuropatología de la enfermedad; también se observa una reducción ya desde los inicios de esta patología (Zhou *et al.*, 2003). Por esta razón se ha sugerido que la disminución de los niveles de esta indolamina participa en la patogénesis de este padecimiento.

El ritmo de secreción de la melatonina durante el día y la noche está alterado en ancianos y presenta un avance de fase en relación con sujetos jóvenes (Skene y Swaab, 2003). Además, el perfil de secreción de la melatonina plasmática muestra un aplanamiento durante la noche en sujetos ancianos con o sin demencia (Magri *et al.*, 2004). De igual manera, los sujetos ancianos, y sobre todo los pacientes con demencia, presentan una reducción significativa en la amplitud circadiana (diferencia entre los valores en el pico y en el nadir del perfil circadiano) de la melatonina (Magri *et al.*, 2004).

II.2.Melatonina

En 1958, Aaron Lerner y colaboradores aislaron melatonina a partir de 200 000 glándulas pineales de bovino. Le dieron ese nombre por la fusión de dos vocablos latinos: *melanos*, 'negro', y *tonos*, 'fuerza', pues McCord y Allen (1917), y Bors y Ralston (1951), habían reportado que la inyección de extractos de glándula pineal a anfibios y peces disminuía la tonalidad del color de la piel. Más adelante, Takahashi y Lerner (*cit. en Lerner et al.*, 1958) descubrieron que estos extractos disminuían la agregación de gránulos de melanina en los melanocitos en la piel de los anfibios, y revertían el efecto oscurecedor de la hormona estimulante de los melanocitos.

A partir de los experimentos de Lerner se inició el estudio formal de la fisiología de la glándula pineal y la hormona que produce, melatonina. En vertebrados, la melatonina se produce principalmente por la glándula pineal (Arendt, 1995). Sin embargo, también se produce en la retina, glándula Harderian, intestinos, médula espinal, plaquetas y piel (Bubenik, 2002; Conti *et al.*, 2000; Djeridane y Touitou, 2001; Iuvone *et al.*, 2005; Slominski *et al.*, 2007). En la glándula pineal esta indolamina se sintetiza por los pinealocitos, mientras que en la retina, por las células fotorreceptoras

(Arendt, 1995; Cahill y Besharse, 1995). Su precursor es el aminoácido triptófano capturado por los pinealocitos mediante transporte activo. El triptófano se convierte en 5-hidroxitriptofano por acción de la enzima triptófano hidroxilasa (Lovenberg *et al.*, 1967), y se decarboxila por la enzima 5-hidroxitriptófano decarboxilasa para dar origen a la serotonina (Lovenberg *et al.*, 1962). Esta última se metaboliza en la glándula pineal a través de diversas rutas, como deaminación oxidativa para formar 5-hidroxiindol acetilaldehído (Axelrod *et al.*, 1969), O-metilación con la formación resultante de 5-metoxitriptamina (Axelrod y Weissbach, 1960) y N-acetilación para formar N-acetilserotonina (Weissbach *et al.*, 1960), precursor inmediato de melatonina. En la figura 3 se muestra la vía de síntesis de la melatonina así como las enzimas participantes. La tasa de formación de esta indolamina depende de la actividad de la serotonina N-acetiltransferasa (Iuvone *et al.*, 2005; Klein, 2007) y, en menor extensión, de la triptófano hidroxilasa, la cual controla la disponibilidad de la serotonina (Cahill y Besharse, 1995; Thomas *et al.*, 1998). La producción de melatonina también recibe la influencia de algunos factores nutricionales, como triptófano, folato y vitamina B6 (Fournier *et al.*, 2002; Luboshitzky *et al.*, 2002; Viswanathan *et al.*, 1988; Zimmermann *et al.*, 1993).

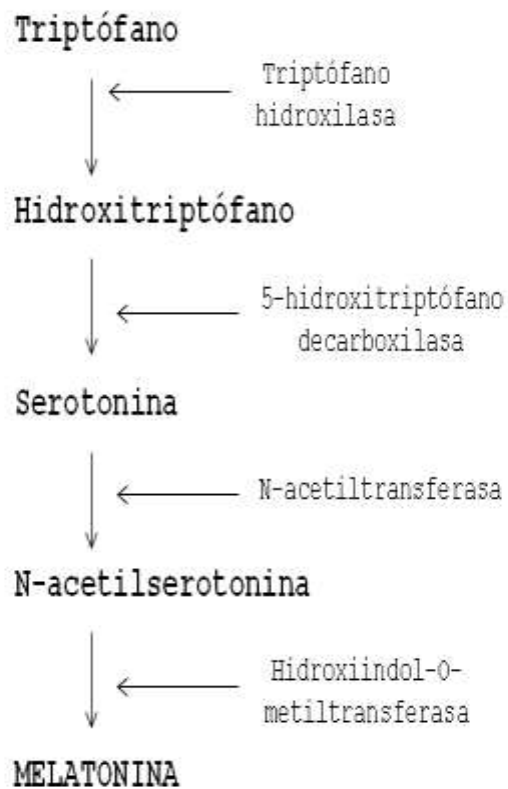


Figura 3. Síntesis de la melatonina.

El ritmo de secreción de la melatonina es estable y se conserva en muchas condiciones fisiológicas. La serotonina, precursora de la melatonina, se encuentra en la glándula pineal con una concentración 100 veces mayor que en el cerebro, donde actúa como neurotransmisor importante con numerosas funciones.

La producción circadiana de la melatonina por la glándula pineal es resultado del mensaje neural que llega

del núcleo supraquiasmático en el hipotálamo. Debido a su alta lipofilicidad, esta indolamina se libera a la circulación y tiene acceso a varios fluidos, tejidos y compartimientos celulares. Más de 90% de la melatonina circulante se metaboliza a 6-hidroxi melatonina en el hígado (Pardridge y Meitus, 1980). Los niveles de melatonina son más altos durante la fase de oscuridad de cualquier ciclo de iluminación luz-oscuridad impuesto o natural (Reiter, 1993), independientemente de que una especie animal dada sea activa durante el día (diurna), durante la noche (nocturna) o exhiba un patrón de actividad crepuscular. Sin embargo, el ritmo y patrón del incremento nocturno en la producción de melatonina depende de las especies y los tejidos. En el ser humano, la rata, el conejillo de indias y la ardilla de tierra, el patrón de producción de la indolamina durante la noche se caracteriza por un pico a mitad del periodo de la oscuridad. Los niveles de esta hormona en la pineal aumentan poco a poco: comienzan a elevarse al inicio de la oscuridad (21:00 a 22:00 hr), alcanzan un pico a mitad de la noche (2:00 y 4:00 hr) y declinan lentamente durante su segunda mitad, hasta alcanzar los valores más bajos durante el día (7:00 y 9:00 hr) (Arendt, 1995). Los niveles máximos en el plasma en sujetos adultos varían de 60 a 70 pg/ml, en tanto que las concentraciones en saliva son aproximadamente de una tercera parte de las

observadas en el plasma. Las cantidades mínimas en ambos fluidos suelen ubicarse por debajo de 5 pg/ml.

La información sobre la oscuridad llega a la glándula pineal de maneras diferentes en mamíferos y en vertebrados no mamíferos (peces, anfibios, réptiles y aves). En estos últimos, los pinealocitos son sensibles a la luz y, por eso, la glándula pineal se controla directamente por el ciclo externo del fotoperiodo. En los mamíferos se ha perdido la sensibilidad directa a la luz. En su lugar, la información sobre el ciclo de iluminación externa se transmite por una ruta neuronal con los siguientes componentes (Moore *et al.*, 1996):

1. Células ganglionares de la retina, cuyos axones comprenden la proyección del tracto retino-hipotalámico al núcleo supraquiasmático.
2. Núcleo supraquiasmático, el cual genera una señal circadiana con una velocidad de descarga alta durante el día y una velocidad de descarga baja durante la noche.
3. Proyecciones del núcleo supraquiasmático a la subdivisión autónoma parvocelular del núcleo paraventricular.
4. Proyecciones del núcleo paraventricular parvocelular a través del haz del cerebro

anterior medial y la formación reticular del tallo cerebral a la columna celular intermediolateral de los segmentos T1-T3 de la médula espinal.

5. Proyecciones de la columna celular intermediolateral al ganglio cervical superior.

6. Proyecciones del ganglio cervical superior a través del simpático cervical a la pineal.

La señal inhibitoria rítmica del núcleo supraquiasmático provoca un bajo nivel de producción de melatonina durante el día y un alto nivel recíproco de producción de esta hormona en la noche que refleja una gran actividad neural en los componentes del circuito del núcleo paraventricular a la innervación simpática de la pineal.

II.2.1. Melatonina y sincronización de los ritmos circadianos

Los ritmos diarios de los procesos conductuales y fisiológicos son una característica común en los organismos vivos; dependen de un sistema complejo que permite una organización temporal óptima y anticipatoria en relación con alteraciones periódicas del medioambiente. En los mamíferos, el punto focal de este sistema es el reloj circadiano maestro, localizado en el

núcleo supraquiasmático. Este núcleo es autónomo pero requiere entradas exógenas con el fin de mantener el tiempo, y, cuando se ve privado de claves externas, corre en un periodo determinado intrínsecamente (más largo o más corto que 24 hr). La sincronización implica ajustes regulares del marcapaso circadiano, conocidos como cambios de fase, que dependen de la exposición a claves de tiempo del medioambiente, en particular el ciclo diario día-noche. El núcleo supraquiasmático lleva esta señal de tiempo por conducto de conexiones neurales (fibras nerviosas autónomas), claves hormonales (como corticosterona, hormona del crecimiento, melatonina, etc.) y claves conductuales rítmicas (Buijs y Kalsbeek, 2001).

La secreción nocturna de la melatonina es una señal endócrina del reloj circadiano. La melatonina proporciona al organismo información circadiana, y puede considerarse un sincronizador endógeno capaz no sólo de estabilizar los ritmos circadianos, sino también de reforzarlos y mantener su mutua relación de fase. Redman y Armstrong (1983) fueron los primeros en determinar el papel de la melatonina en la sincronización de los ritmos circadianos; demostraron que los ritmos de actividad de libre corrimiento de la rata se sincronizan por la administración diaria de melatonina (1 mg/kg). Más adelante, se demostró la sincronización de los ritmos de

libre corrimiento por melatonina en humanos (Lockley et al., 2000; Sack et al., 2000).

Debido a la presencia de receptores de melatonina dentro del núcleo supraquiasmático, se estableció que tiene propiedades cronobióticas, lo que significa que es capaz de ajustar, directa o indirectamente, el tiempo de los ritmos biológicos internos (por ejemplo, la fase y/o el periodo del reloj circadiano). Por esta razón, a partir de una acción sobre el reloj circadiano, la melatonina ejerce una acción directa en todos los niveles de la estructura circadiana en los mamíferos. Así, la melatonina y sus agonistas se emplean como cronobióticos para tratar y prevenir los trastornos del sueño circadiano y otras alteraciones observadas en sujetos ciegos, trabajadores nocturnos y quienes presentan síntomas asociados al *jet lag*.

II.2.2.Papel sincronizador de la melatonina en el citoesqueleto

Como se mencionó en la sección anterior, la melatonina es una señal sincronizadora que desempeña un papel central en el control de los ritmos circadianos en muchas especies de reptiles, aves y mamíferos. Sin embargo, poco se sabe respecto de sus efectos sincronizadores en los

niveles celular y molecular, en particular en el citoesqueleto.

En las neuronas, la organización del citoesqueleto tiene un papel clave para determinar la forma asimétrica necesaria para recibir y transmitir información mediante procesos celulares especializados, dendritas y axones. Estas estructuras se forman a partir de la polimerización de actina y tubulina (Lodish *et al.*, 1995). El ensamblaje de los microfilamentos de actina (Actina-F) comienza con la agregación de actina globular (actina-G) en oligómeros cortos e inestables que se alargan rápidamente por la adición de actina-G en ambos extremos para formar un filamento. La polimerización de actina se acompaña de hidrólisis de adenosín trifosfato (ATP) (figura 4). El ensamblaje de los microtúbulos implica la formación de protofilamentos de heterodímeros de subunidades de tubulina (α y β) (interacciones longitudinales), seguida de la asociación de estos protofilamentos para formar la pared de los microtúbulos (interacciones laterales). La polimerización de los microtúbulos se acompaña de hidrólisis de guanosín trifosfato (GTP) (figura 5). Los microfilamentos de actina y los microtúbulos se forman a partir de un *pool* de actina o tubulina globular despolimerizada en equilibrio dinámico con actina o tubulina polimerizada.

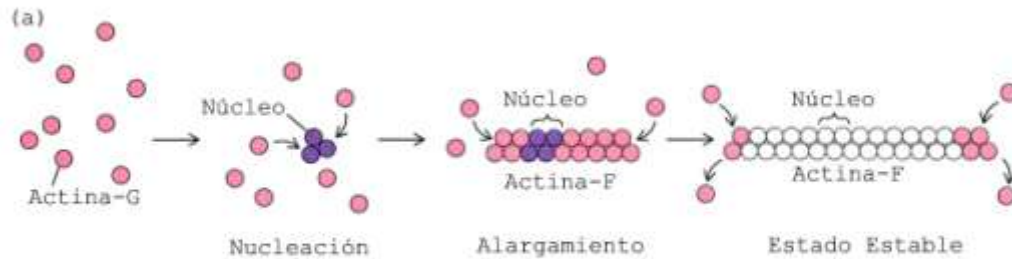


Figura 4. Fases de la polimerización de actina. Durante la polimerización de actina-G *in vitro*, el conglomerado de filamentos de actina se incrementa después de un periodo inicial lag y a la larga alcanza un estado estable. En la primera fase, los monómeros de actina se unen con ATP (subunidades en rosa), forman el núcleo -complejos estables de actina (subunidades en morado)- que en la segunda fase se alarga por la adición de subunidades en ambos extremos del filamento. En la tercera fase de ensamblaje, el estado estable, los extremos de los filamentos de actina están en equilibrio con la actina-G-ATP monomérica. Después de su incorporación al filamento, las subunidades lentamente hidrolizan ATP y llegan a ser actina-F-ADP estable (subunidades en blanco). Tomado de Lodish et al., 1995.

Existen evidencias de que el ciclo luz-oscuridad regula la organización del citoesqueleto en organismos unicelulares y plantas. En un estudio se observó que en el alga *Euglena gracilis* I. ocurren cambios en el citoesqueleto y forma de la célula asociados al ciclo luz-oscuridad (Lonergan, 1983). La citocalasina B y la colchicina, fármacos que interfieren con la organización de microfilamentos y microtúbulos, respectivamente, bloquean los cambios rítmicos que se producen en la forma de la célula de este organismo, lo que sugiere que la estructura del citoesqueleto también puede ser blanco de los agentes sincronizadores (Lonergan, 1983). Asimismo, el fotoperiodo regula cíclicamente la expresión de las proteínas del citoesqueleto en la planta *Vicia faba* L.

Las células guarda de esta planta presentan un ciclo diurno en los niveles de tubulina alfa y beta (Fukuda *et al.*, 2000).

De igual manera, tanto en células en cultivo como en el animal íntegro se ha mostrado que la melatonina modifica cíclicamente al citoesqueleto. La incubación de las células MDCK con concentraciones nanomolares de melatonina y un patrón de administración similar a la secreción y liberación cíclica del indol en el plasma produce un incremento en la formación de las fibras de tensión y en el transporte de agua, lo cual depende de la organización de los microfilamentos. Además, en las células N1E-115, las concentraciones nanomolares de la melatonina causan un incremento en la formación de los conos de crecimiento y células con neuritas más largas, fenotipos especializados del citoesqueleto formados por microfilamentos y microtúbulos (Bellón *et al.*, 2007). Por otro lado, se ha descrito que la administración de la melatonina (500 µg/kg dos veces al día por 14 días) a ratas incrementa el contenido de microtúbulos en la glándula pineal (Freire y Cardinali, 1975). Además, estos autores observaron que los animales expuestos a oscuridad constante (2 semanas) presentan un incremento en la cantidad de microtúbulos en esta glándula.

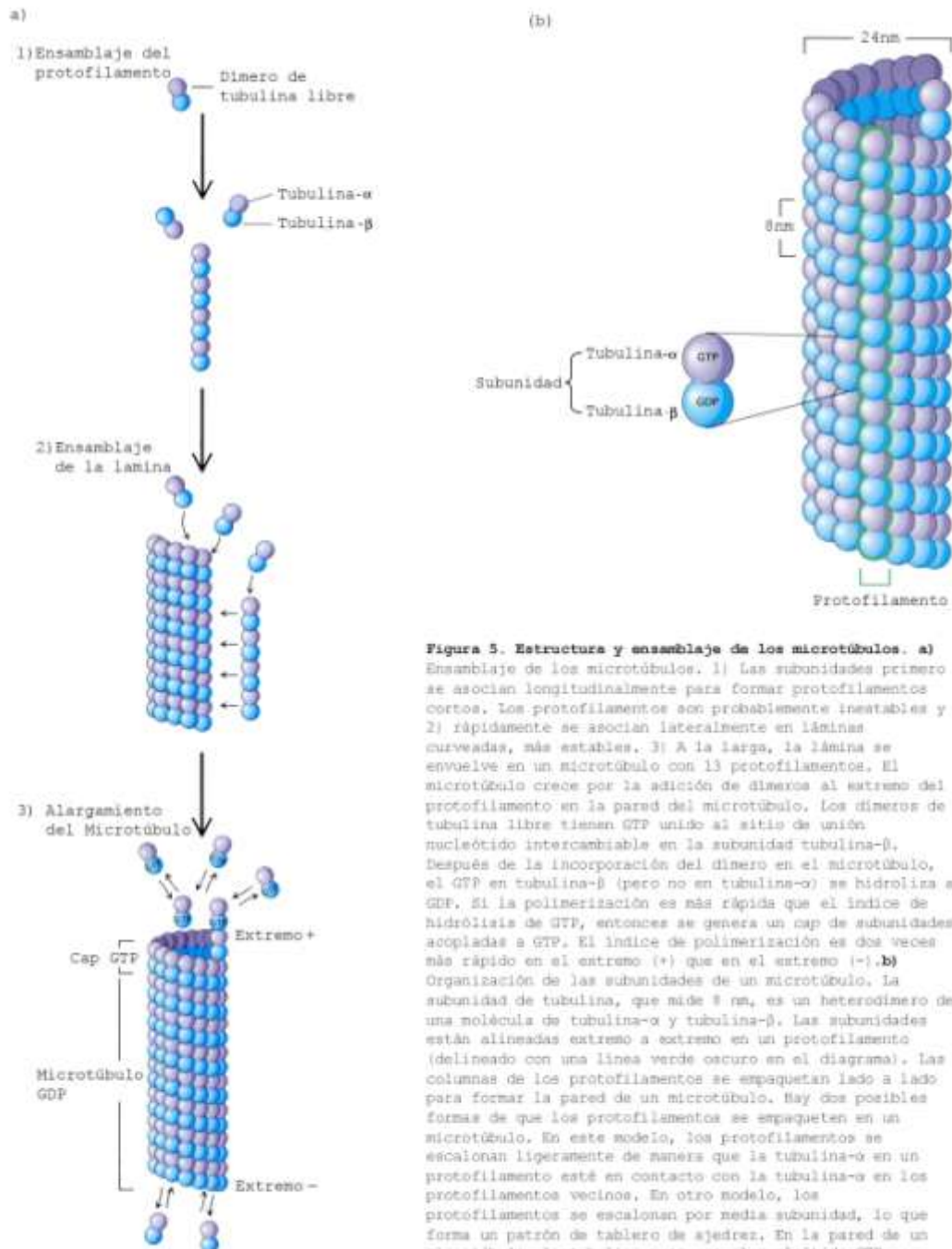


Figura 5. Estructura y ensamblaje de los microtúbulos. a) Ensamblaje de los microtúbulos. 1) Las subunidades primero se asocian longitudinalmente para formar protofilamentos cortos. Los protofilamentos son probablemente inestables y 2) rápidamente se asocian lateralmente en láminas curvadas, más estables. 3) A la larga, la lámina se envuelve en un microtúbulo con 13 protofilamentos. El microtúbulo crece por la adición de dímeros al extremo del protofilamento en la pared del microtúbulo. Los dímeros de tubulina libre tienen GTP unido al sitio de unión nucleótido intercambiable en la subunidad tubulina- β . Después de la incorporación del dímero en el microtúbulo, el GTP en tubulina- β (pero no en tubulina- α) se hidroliza a GDP. Si la polimerización es más rápida que el índice de hidrólisis de GTP, entonces se genera un cap de subunidades acopladas a GTP. El índice de polimerización es dos veces más rápido en el extremo (+) que en el extremo (-). b) Organización de las subunidades de un microtúbulo. La subunidad de tubulina, que mide 8 nm, es un heterodímero de una molécula de tubulina- α y tubulina- β . Las subunidades están alineadas extremo a extremo en un protofilamento (delineado con una línea verde oscuro en el diagrama). Las columnas de los protofilamentos se empaquetan lado a lado para formar la pared de un microtúbulo. Hay dos posibles formas de que los protofilamentos se empaqueten en un microtúbulo. En este modelo, los protofilamentos se escalonan ligeramente de manera que la tubulina- α en un protofilamento esté en contacto con la tubulina- α en los protofilamentos vecinos. En otro modelo, los protofilamentos se escalonan por media subunidad, lo que forma un patrón de tablero de ajedrez. En la pared de un microtúbulo, la tubulina- α se une al nucleótido GTP mientras GDP se une a la tubulina- β . Tomado de Iodish et al. (1995).

El mecanismo de acción del efecto sincronizador de la melatonina en el transporte de agua a través de un rearrreglo del citoesqueleto en las células MDCK, así como el alargamiento de las neuritas en las células NIE-115,

está mediado por un antagonismo de la calmodulina (Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2003; Huerto-Delgadillo *et al.*, 1994; Benítez-King *et al.*, 1990, 1993). Se ha descrito que la melatonina tiene acceso a muchos tipos de células. Esto ocurre porque es una molécula pequeña y muy lipofílica que atraviesa sin dificultad la bicapa lipídica de la membrana celular (Costa *et al.*, 1995). La evidencia de que la melatonina entra en las neuronas se reportó en un estudio en el cual se administró intracerebroventricularmente melatonina radioactiva y se observó que la mayor proporción de radioactividad se presentó en el citosol, mientras que en la fracción nuclear y mitocondrial la proporción de radioactividad fue menor (Antón-Tay *et al.*, 1988). Existe evidencia que sugiere que la calmodulina puede estar relacionada con el reconocimiento intracelular de la señal de melatonina. Esta hormona se une a esta proteína en presencia de calcio, e inhibe a la fosfodiesterasa dependiente de calmodulina actuando como antagonista (Benítez-King *et al.*, 1991).

A partir de los antecedentes recién descritos es posible suponer que la secreción rítmica de la melatonina durante el ciclo luz-oscuridad modifica también rítmicamente la organización de los componentes del citoesqueleto.

II.2.3.Melatonina y memoria

Se ha sugerido que la melatonina tiene un papel importante en varios procesos conductuales tales como sueño, actividad motora, aprendizaje y memoria (Jean-Louis *et al.*, 1999; Kovács *et al.*, 1974; Ling *et al.*, 2009).

Se menciona que la melatonina puede influir en la formación de la memoria en el hipocampo (El-Sherif *et al.*, 2003). Ling *et al.* (2009) observaron que en ratas a las cuales se les realizó pinealectomía funcional (ratas expuestas a iluminación constante durante 30 días) presentaron un déficit de memoria espacial al emplear el laberinto acuático de Morris. Asimismo encontraron un incremento de fosforilación de la proteína tau, un desbalance en el sistema de fosforilación-defosforilación y un incremento en el estrés oxidativo en el hipocampo. Sin embargo, la administración de melatonina (1 mg/kg y 10 mg/kg) mejoró el déficit de la memoria espacial en estos animales, disminuyó la hiperfosforilación de la proteína tau, suprimió la elevación de las cinasas GSK3 y PKA, incrementó la actividad de las fosfatasas PP-2A y PP-1, y disminuyó el estrés oxidativo. Por otra parte, Karakas *et al.*, 2011 encontraron un déficit en la ejecución de la memoria espacial al emplear el laberinto acuático de Morris en animales pinealectomizados.

En otro estudio, Olcese *et al.*, 2009, con el objetivo de evaluar el efecto del tratamiento de largo plazo de melatonina (0.5 mg diarios por 6 semanas) en la cognición y en el desarrollo de la neuropatología beta amiloide, emplearon un modelo de ratón manipulado genéticamente que presenta la neuropatología de la enfermedad de Alzheimer (ratones transgénicos a la proteína precursora amiloide y a la presenilina 1). Observaron que los ratones transgénicos presentan un daño en la ejecución en el laberinto en Y, sin embargo, la administración de la melatonina mejora la función de la memoria basada en el hipocampo, pues los animales transgénicos ejecutaron eficientemente esta prueba. Además, al realizar una tarea en una plataforma circular observaron que la melatonina facilita el aprendizaje de referencia espacial y las habilidades de la memoria en ratones transgénicos. Por último, encontraron que la administración crónica de melatonina normaliza la ejecución de la memoria de trabajo en los ratones transgénicos para la enfermedad de Alzheimer al emplear el laberinto radial acuático de 6 brazos. Además de la mejora cognitiva en virtud de la administración de melatonina, se observó que estos ratones presentaron una disminución en los niveles y agregación/deposición de la proteína beta amiloide en el cerebro.

Del mismo modo, Brusco *et al.* (2000) evaluaron el efecto de la melatonina en el sueño y en las alteraciones cognitivas en pacientes con enfermedad de Alzheimer. Estos autores observaron que la melatonina en una dosis de 9 mg durante 22 a 35 meses mejora la calidad del sueño y detiene la progresión de los signos cognitivos y conductuales de la enfermedad, por lo que concluyen que la melatonina puede ser benéfica para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Estas evidencias sugieren que los niveles disminuidos de melatonina producen déficit de la memoria dependiente del hipocampo, y que la administración de esta hormona revierte estas alteraciones.

II.2.3.1.El hipocampo y la integración de la memoria

En roedores, el hipocampo suele estar involucrado en los tipos de memoria espacial o relacional. Ratas con daño en el hipocampo presentan una conducta hiperactiva en un medioambiente nuevo, son "perseverantes" y resistentes a la extinción de tareas que aprenden, no prestan atención a cambios drásticos en su medioambiente y presentan un desempeño deficiente en tareas espaciales —como laberintos— y tareas que requieren la alteración de respuestas en ensayos sucesivos (Douglas, 1967; Kimble,

1968). Estos déficit pueden deberse a la pérdida del sistema neural que proporciona al animal un mapa cognitivo y espacial de su medioambiente (Tolman, 1948). O'Keefe y Dostrovsky (1971) descubrieron las "células de lugar" en el hipocampo, las cuales descargan preferencialmente cuando una rata está en una localización espacial específica en un medioambiente determinado. Estos autores establecen que el hipocampo es una estructura que representa en el cerebro un mapa de referencia espacial.

O'Keefe y Nadel (1979) establecen que el hipocampo funciona como mapa cognitivo a partir de las siguientes conclusiones:

1. El hipocampo construye y almacena representaciones de mapas cognitivos, los cuales capturan el arreglo espacial del medioambiente experimentado por un animal.
2. Estos mapas proporcionan las bases para una cognición espacial no egocéntrica objetiva.
3. Los mapas cognitivos son útiles para diversos propósitos, como el éxito para recolectar agua o comida, localizar animales de la misma especie, territorios y refugios seguros, una guía para la navegación, migración, etcétera.

4. La fisiología y anatomía del sistema hipocampal está acorde con la noción de mapeo. En particular, es importante la existencia de neuronas que codifican lugares y detectan novedades. El hecho de que la actividad theta se relacione con desplazamientos del animal en el espacio proporciona un mecanismo por el cual la información de la distancia está disponible para el sistema de mapeo.
5. Las consecuencias de daño en el hipocampo pueden comprenderse en términos de efectos directos e indirectos. Los efectos directos incluyen la pérdida de exploración/detección ante las novedades y de aprendizaje de lugares. Los efectos indirectos, como una mayor perseverancia y susceptibilidad a la interferencia, derivan de la dependencia alternativa de estrategias conductuales a menudo inadaptativas.

Olton et al., en 1978, demostraron también la participación del hipocampo en la mediación de la conducta organizada espacialmente. Estos autores encontraron que la destrucción de las principales conexiones del hipocampo (área entorrinal, cuerpo del fimbria-fornix anterior al hipocampo, septum y fornix postcomisural) produce un déficit grave y duradero en la ejecución de la memoria en el laberinto radial de 8 brazos. Otros experimentos comprueban que lesiones

hipocampales producidas por inyecciones de ácido iboténico producen daño en la adquisición de la versión espacial del laberinto radial en dos funciones de la memoria (de referencia —que representa el conocimiento de aspectos de una tarea que permanecen constantes entre ensayos— y de trabajo) (Jarrard, 1993).

El propósito del sistema de memoria y aprendizaje concerniente al hipocampo es adquirir información sobre relaciones entre estímulos (Eichenbaum *et al.*, 1992; Hirsh, 1974, 1980; O'Keefe y Nadel, 1978; Sutherland y Rudy, 1989). Este tipo de información puede disminuir la ambigüedad en situaciones de aprendizaje que requieren que un estímulo particular tenga diferentes significados basados en la presencia o ausencia de otro estímulo. Estos procesamientos contribuirían a identificar y recordar múltiples localizaciones espaciales (McDonald y White, 1993). Se reporta que las ratas a las cuales se les produce daño en el hipocampo cometen más errores en el laberinto radial de 8 brazos; este resultado es consistente con la idea de que el sistema hipocampal es necesario para tareas que requieren información sobre relaciones entre claves para una ejecución precisa (McDonald y White, 1993).

El laberinto radial es un modelo para evaluar la memoria espacial y la de trabajo. La memoria de trabajo

se refiere a la habilidad de mantener en mente la información lo suficiente para efectuar acciones secuenciales. En el procedimiento de la memoria de trabajo, la información del estímulo es útil para ensayar un experimento, pero no para ensayos subsecuentes (Honig, 1978). Así, la prueba del laberinto radial incorpora el procedimiento de la memoria de trabajo (Olton *et al.*, 1979) pues, en cada prueba, en la primera aproximación a cada brazo la rata debe obtener el alimento al final de él. En las subsiguientes aproximaciones en este test, la rata no debe elegir un brazo ya elegido porque el alimento se ha retirado.

En consecuencia, la rata debe recordar cada elección durante toda la prueba, pero al final de cada prueba debe olvidar estas elecciones de manera que no interfieran con las pruebas subsecuentes. Por añadidura, la tarea en el laberinto radial requiere un componente de mapeo cognitivo, pues los animales necesitan mantener la relación de los estímulos externos al laberinto durante la prueba de manera que tengan oportunidad de usar esta información en el momento en que deban elegir un brazo (Olton y Feustle, 1981). En conclusión, para una buena ejecución en el laberinto radial son importantes los estímulos externos del laberinto y la incorporación del procedimiento de la memoria de trabajo.

En ratas a las cuales se les realizó una destrucción bilateral del fimbria-fornix posterior al septum y anterior al hipocampo se observó que presentan un déficit grave y duradero en la ejecución en el laberinto de 4 brazos (Walker y Olton, 1984), ocho brazos (Becker *et al.*, 1978; Olton *et al.*, 1978) y 17 brazos (Olton y Werz, 1978). De igual manera, inyecciones bilaterales de ácido kaínico en el área CA3 del hipocampo producen destrucción de las células piramidales en esta área y un déficit en la ejecución en el laberinto radial de 8 brazos (Handelman *et al.*, 1978). Estos autores reportan que si las inyecciones con ácido kaínico se realizaron antes de la prueba, los animales no logran aprender la tarea en un límite de 50 sesiones. Sin embargo, si se administran las inyecciones después de un entrenamiento preoperativo, las ratas presentan un daño grave en la ejecución pero llegan a recuperarse, y se observa que al final de 50 sesiones la ejecución del animal en el laberinto radial se realiza normalmente.

Otros estudios muestran que la destrucción selectiva del área CA1 del hipocampo produce un deterioro en la adquisición pero no en la retención de la ejecución en el laberinto radial de ocho brazos, mientras la destrucción del fimbria con la interrupción de las fibras del área CA3 del hipocampo daña tanto la adquisición como la retención de la ejecución (Jarrard, 1978). Olton *et al.*

(1979) establecen, a partir de los resultados obtenidos en ratas con lesión en el sistema hipocampal, que hay una participación selectiva de este sistema en la memoria de trabajo en la cual los estímulos discriminativos son las claves externas del laberinto.

II.3.Utilidad de la melatonina en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer

Se han aplicado modelos experimentales de neurodegeneración para reproducir cambios moleculares y bioquímicos presentes en la enfermedad de Alzheimer. Estas condiciones pueden ser útiles para esclarecer los mecanismos de la patofisiología de las demencias y también para investigar nuevas estrategias potenciales para el tratamiento y prevención de estas enfermedades.

El ácido ocadáico, sustancia empleada como estrategia experimental para el estudio de la enfermedad de Alzheimer, produce en neuronas de cultivo primario y en el cerebro de la rata cambios estructurales y moleculares similares a los observados en esta enfermedad (Arias *et al.*, 1993; Kim *et al.*, 1999). El ácido ocadáico es un inhibidor de las proteínas fosfatasa (PP) serina/treonina 1 y 2A (Bialojan y Takai, 1988). Este

compuesto causa un incremento en la cantidad de tau hiperfosforilada en las células de neuroblastoma SKNSH-SY 5Y (Dupont-Wallois *et al.*, 1995), en las células PC12 (Chiou y Westhead, 1992) y en las células N1E-115 (Jiménez-Rubio *et al.*, 2007).

Varios estudios revelan el efecto de la melatonina en la fosforilación de la proteína tau y en la regulación de las cinasas y fosfatasas participantes en la fosforilación de esta proteína. El empleo del ácido ocadáico mostró que, en las células N1E-115, la melatonina (100 nM) reestableció la neuritogénesis en células dañadas con este compuesto y bloqueó la fosforilación de tau anormal (Jiménez-Rubio *et al.*, 2007). Li *et al.* (2005) demostraron que esta hormona (25 μ M y 50 μ M) atenuó significativamente la hiperfosforilación de tau inducida por otro inhibidor de las fosfatasas, caliculina A. Además, esta indolamina no solo interrumpió la inhibición de PP-2A inducida por caliculina A sino también incrementó de manera notable la actividad de la fosfatasa por arriba de sus niveles normales. Además, 25 μ M de melatonina suprime la sobreactivación de GSK-3 inducida por caliculina A y, cuando se incrementó la concentración a 50 μ M, inhibió la actividad basal de GSK-3 (Li *et al.*, 2005). Por último, esta hormona previene el daño oxidativo producido por caliculina-A, pues esta indolamina decrementó el nivel de

maloldialdehído e incrementó la actividad de superóxido dismutasa (Li *et al.*, 2005).

Otros experimentos muestran que la melatonina atenúa la hiperfosforilación de la proteína tau inducida con haloperidol (Zhu *et al.*, 2004; Benítez-King *et al.*, 2010), isoproterenol (Wang *et al.*, 2005) y wortmannin (Liu y Wang, 2002). Además, esta indolamina reduce las alteraciones producidas por estos compuestos en el nivel de estrés oxidativo así como de la actividad de las proteínas cinasas y las proteínas fosfatasas. Zhu *et al.* (2004) mostraron que la inhibición de la biosíntesis de esta hormona producida por el haloperidol induce déficit en la retención de la memoria espacial en ratas e hiperfosforilación de la proteína tau en los sitios tau-1 y PHF-1, asociados a un decremento en la PP-2A. El suplemento exógeno de la melatonina antes y durante la infusión del haloperidol redujo parcialmente estos déficit. Por su parte, Benítez-King *et al.* (2010) encontraron que la incubación con haloperidol (100 μ M) a las células N1E-115 durante 24 hr produce un incremento en la hiperfosforilación de la proteína tau, y que la administración de la melatonina (1×10^{-7} M) bloquea este incremento. Por su parte, Wang *et al.* (2005) demostraron que el pretratamiento con esta indolamina atenúa la hiperfosforilación de tau producida por el isoproterenol-agonista del receptor β , empleado para la activación de

la proteína cinasa A (PKA)- en ratas. En el trabajo de Liu y Wang (2002) se reporta que la hiperfosforilación de tau se indujo *in vivo* en el cerebro de la rata por wortmannin, inhibidor específico de PI-3K, empleado como estimulador específico de GSK-3, y que la modificación anormal de tau se inhibe parcialmente con la preinyección de melatonina ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ y $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$).

Se desconoce el mecanismo por medio del cual la melatonina decrementa la hiperfosforilación de tau. Sin embargo, se ha propuesto que esta hormona actúa como modulador del equilibrio metabólico de fosforilación-defosforilación dentro de la célula (Benítez-King *et al.*, 2006). Esta indolamina activa a la PKC tanto *in vitro* como en las células mantenidas en cultivo; inhibe también la actividad de la proteína cinasa II dependiente de calcio calmodulina (CaM cinasa II) y activa la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK), la cinasa ERK 1/2 (MAPK/ERK) y la cinasa asociada a Rho (ROCK), río abajo de la ruta de señalización de la PKC (Benítez-King *et al.*, 1996; Antón-Tay *et al.*, 1998; Soto-Vega *et al.*, 2004; Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2003). Además, la actividad de la PP2A y la GSK-3 se incrementa y decrementa por la melatonina, respectivamente, en homogenados de células neuronales (Li *et al.*, 2005). Estas evidencias sugieren que el desbalance en la

fosforilación presente en las enfermedades neurodegenerativas pueden equilibrarse con melatonina.

Por otro lado, es posible que las propiedades antioxidantes de la melatonina tengan que ver en la prevención de la fosforilación de la proteína tau. Se ha demostrado que el estrés oxidativo participa en la neurodegeneración (Perry *et al.*, 2002), en las alteraciones de la estructura del citoesqueleto y en la hiperfosforilación de la proteína tau (Smith *et al.*, 2000; Milzani *et al.*, 1997; Borg *et al.*, 2002). Además, la melatonina decrementa la lipoperoxidación lipídica y la apoptosis producida por la administración de ácido ocadáico (Benítez-King *et al.*, 2003) o peróxido de hidrógeno (Benítez-King *et al.*, 2005).

La eficacia de la melatonina para el tratamiento de los pacientes con enfermedad de Alzheimer se apoya en varios estudios. Por ejemplo, en un grupo de pacientes con demencia, la administración oral de una dosis de 3 mg de melatonina a la hora de dormir permitió un decremento de la "agitación al atardecer" y una reducción de la variabilidad en la hora de comienzo del sueño (Fainstein *et al.*, 1997). En otro grupo de sujetos con daño cognitivo moderado, la administración de 6 mg de esta hormona produjo una mejora en el sueño, estado de ánimo y memoria (Jean-Louis *et al.*, 1998). Otro estudio más

mostró la eficacia de esta indolamina en el mejoramiento del sueño y el alivio de síntomas de la "agitación al atardecer" en pacientes ancianos con enfermedad de Alzheimer (Cohen-Mansfield *et al.*, 2000). Asimismo se observó una mejora en la calidad del sueño en pacientes con enfermedad de Alzheimer tratados diariamente con 6-9 mg de melatonina durante un periodo de 2 a 3 años (Brusco *et al.*, 1998, 2000). Asayama y colaboradores (2003) reportaron que la administración de 3 mg de esta indolamina por 4 semanas prolongó el tiempo de sueño y decrementó la actividad durante la noche; además, los pacientes mostraron una mejora en el desempeño cognitivo. En otro estudio con evaluación actigráfica del ciclo sueño/vigilia se observó una mejora en el sueño y reducción de la "agitación al atardecer" en pacientes con enfermedad de Alzheimer tratados con 3 mg de melatonina diarios (Mahlberg *et al.*, 2004). También se reporta un efecto benéfico de esta hormona en la calidad del sueño de pacientes con enfermedad de Alzheimer tratados durante 4 meses con una dosis de 6 a 9 mg/día (Cardinali *et al.*, 2002). En otro estudio se administraron dos formulaciones de melatonina oral (2.5 mg de melatonina de liberación lenta y 10 mg de melatonina) a 157 sujetos con enfermedad de Alzheimer y alteraciones durante el sueño, y se demostró que, comparados con el placebo, las dos formulaciones de esta hormona produjeron un incremento en

el tiempo total de sueño y un decremento en la vigilia después del inicio de sueño; asimismo, las enfermeras reportaron en mediciones subjetivas que la calidad del sueño mejoró en la formulación de 2.5 mg de melatonina en estos pacientes (Singer *et al.*, 2003).

Como la melatonina es capaz de mejorar algunos síntomas clínicos de la enfermedad de Alzheimer y los niveles de melatonina disminuyen drásticamente en esta enfermedad, los estudios acerca de la relación entre melatonina y patología tau/beta-amiloide, citoesqueleto y cognición pueden ayudar a evaluar y comprender su potencial en la prevención o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

III.HIPÓTESIS

Si la melatonina modula la organización del citoesqueleto en células en cultivo así como la polaridad morfofuncional neuronal, y la disminución en los niveles de la melatonina se asocia a déficit de la memoria espacial dependiente del hipocampo, entonces el incremento de la melatonina observado durante la noche y la administración de esta hormona a animales pinealectomizados producirá un incremento en la cantidad relativa de los microfilamentos y los microtúbulos, así como una mejora en la memoria espacial.

IV.OBJETIVO GENERAL

El objetivo principal del presente proyecto es determinar la cantidad relativa de microfilamentos y microtúbulos en el hipocampo de ratas, así como los cambios en la memoria producidos por pinealectomía y tratamiento posterior con melatonina.

V.OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar las cantidades relativas de actina y tubulina globulares así como de los microfilamentos y los microtúbulos en el hipocampo de la rata, y su relación con los niveles de melatonina durante el día y la noche.

Evaluar las cantidades relativas de actina y tubulina globulares así como de los microfilamentos y los microtúbulos en el hipocampo de ratas pinealectomizadas y tratadas con melatonina.

Establecer la distribución de tubulina en el hipocampo de ratas control, pinealectomizadas y tratadas con melatonina.

Evaluar el efecto de la pinealectomía y tratamiento posterior con melatonina en la memoria de trabajo espacial en ratas.

VI.METODOLOGÍA

VI.1.Animales

Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar (250 ± 20 g), las cuales se mantuvieron en condiciones controladas en un ciclo luz/oscuridad 12/12 hr (las luces se encendieron a las 7:00 hr y se apagaron a las 19:00 hr) y una temperatura ambiente de 23 ± 1 °C. Se les proporcionó agua y comida *ad libitum*. Se cumplió con todas las regulaciones legales e institucionales respecto de la ética y manipulación en animales para los experimentos y aprobadas por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz", México.

Las ratas se dividieron en 5 grupos de 5 ratas cada uno, como sigue:

1. Ratas control (4:00 hr y 14:00 hr). Se sacrificaron ratas por decapitación sin ningún procedimiento quirúrgico ni administración de ningún tratamiento farmacológico en un cuarto oscuro a las 4:00 hr y en un cuarto iluminado a las 14:00 hr.
2. Ratas *sham* (16:00 hr). A las ratas se les realizó la operación *sham* y se sacrificaron por decapitación a las 16:00 hr (12 semanas después de realizada la operación).
3. Ratas pinealectomizadas (Px) 12 semanas (16:00 hr).

A las ratas se les realizó la pinealectomía (Pohlmeyer *et al.*, 1994) y se sacrificaron 12 semanas después por decapitación en el periodo de luz.

4. Ratas Px 12 semanas + vehículo (16:00 hr). A las ratas se les realizó la pinealectomía y 12 semanas después se les administró vía intraperitoneal [i.p.] vehículo (etanol + solución salina) durante una semana a las 10:00 hr; después se sacrificaron por decapitación 6 hr después de la última administración.

5. Ratas Px 12 semanas + melatonina (16:00 hr). A las ratas se les realizó la pinealectomía y 12 semanas después se les administró melatonina vía i.p. (1 mg/kg; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) durante una semana a las 10:00 hr. Posteriormente se sacrificaron por decapitación 6 hr después de la última administración.

VI.1.1. Pinealectomía

La pinealectomía se realizó con el método descrito por Pohlmeyer *et al.* (1994). Las ratas se anestesiaron con ketamina (100 mg/kg; vía i.p.) y xilazina (20 mg/kg; vía i.m.) y se realizó el procedimiento quirúrgico que se describe a continuación:

1. Se afeitó y limpió con antiséptico el dorso de la

cabeza y nuca del animal anestesiado.

2. Se colocó al animal sobre su superficie ventral y la cabeza se inmovilizó en un estereotáxico.
3. Se realizó una incisión de 1.5 cm en la línea media de los ojos a la base del cráneo y se retrajeron los bordes con el fin de remover el tejido conectivo subyacente. Se hicieron visibles los senos sagitales superior y transversal, y se raspó el periostio.
4. Se empleó un taladro con una broca de punta muy fina. Se perforó un círculo en el cráneo de 5 a 7 mm de diámetro que se centró sobre la confluencia de los senos sagital superior y transversal. El hueso se separó de la dura subyacente, se colocó en solución salina y se volvió a colocar al final del procedimiento.
5. Se realizaron dos cortes longitudinales en la duramadre en los lados derecho e izquierdo del seno sagital superior y se introdujo una aguja con hilo quirúrgico muy delgado debajo del vaso sanguíneo. El seno se ligó dos veces y se cortó entre las ligaduras.
6. La parte posterior del seno se jaló hacia atrás, y quedó entonces expuesta la glándula pineal.
7. Se extrajo la glándula pineal expuesta, que se reconoció como un órgano cristalino pequeño de un diámetro aproximado de 1 mm.

8. Se colocó en su lugar el hueso removido y se cerró la incisión de piel con hilo quirúrgico.

En las operaciones *sham*, los senos ligados se cortaron pero no se jalaron hacia atrás, y de esta manera se evitó el riesgo de daño a la glándula pineal y de interrupción del abastecimiento de sangre a la misma. Durante la recuperación postoperatoria las ratas se colocaron en cajas individuales y se les administró antibiótico durante 7 días en el agua de beber.

VI.2.Determinación de los niveles en suero de melatonina mediante la técnica ELISA

Se evaluaron los niveles en suero de melatonina con la técnica ELISA competitivo (acrónimo de *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) (Reiter, 1996). La evaluación de las muestras se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Kit comercial para ELISA, MP Biomedicals Inc., Irvin, California). Brevemente, se sacrificó a las ratas por decapitación en el periodo de luz o en el de oscuridad, y se recolectó la sangre periférica del tronco del animal. El suero se obtuvo por centrifugación a $2500 \times g$ durante 9 minutos. Los sobrenadantes se almacenaron a -20°C hasta la extracción y determinación de melatonina. La melatonina se detectó por competencia entre un antígeno

biotinilado y uno no biotinilado, antibiotina fosfatasa alcalina como marcador y p-nitrofenil fosfato como sustrato. Se realizó una curva estándar de melatonina (3-300 pg/ml) con el mismo procedimiento. La densidad óptica se detectó a 405 nm (longitud de referencia, 600 nm) en un lector de placas multipozos (Benchmark, Biorad); las concentraciones de la melatonina en las muestras se calcularon con la media de su densidad óptica a partir de la curva estándar del *kit*.

VI.3.Separación de las fracciones citosólica y citoesqueleto membranar

La separación de las fracciones citosólicas y citoesqueleto-membranal se efectuó de acuerdo con Pipeleers *et al.* (1977) y Gillespie *et al.* (1989). Las ratas se sacrificaron por decapitación. Se extrajeron y procesaron los cerebros de las ratas control, *sham*, Px, y Px y tratadas con vehículo o melatonina. Brevemente, el cerebro que se extrajo se colocó en solución salina fría (4 °C), se realizó la disección del hipocampo y se colocó en tubos eppendorf con 500 µl de solución amortiguadora estabilizante de tubulina y actina (pH 7.25), y se homogeneizó 30 s a 4 °C y 40 hertz en un homogeneizador ultrasónico Cole Parmer.

La solución amortiguadora estabilizante para tubulina y actina contenía 100 mM de cloruro de potasio

(KCl), 2 mM de ácido tetra-acético etilénglicol (EGTA), 1 mM de ditionitroreitol (DTT), 1 mM de Guanosina trifosfato (GTP), 0.1 mM de adenosina trifosfato (ATP), 10 mM de imidazol, 0.2% de tritón, 1 mM de fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF) y 25 µg/ml de leupeptina, pepstatina y aprotinina. A continuación se centrifugaron las muestras homogeneizadas a $21\,000 \times g$ por 10 min a 4 °C (centrífuga Hermle, Z233 MK-2) y se obtuvo el sobrenadante; éste se centrifugó a $133\,191 \times g$ por 70 min a 4 °C (centrífuga Sorvall CombiPlus, Dupont). Se obtuvo una pastilla que contiene la fracción citoesqueleto-membranal y el sobrenadante que contiene la fracción citosólica. Después se añadieron 500 µl de solución amortiguadora estabilizante de tubulina y actina a la fracción citoesqueleto-membranal y se homogeneizó.

La concentración de proteína de las fracciones citosólica y citoesqueleto-membranal de los hipocampos de las ratas se determinó por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Se empleó como estándar la albúmina sérica de bovino. Las fracciones se conservaron a -70 °C hasta la realización del análisis de tubulina y actina.

VI.4.Determinación de actina por el método de ELISA

La actina filamentosa (actina-F) y la actina globular (actina-G) se cuantificaron por el método de ELISA. Las placas multipozos se recubrieron con 10 µg de proteína de

hipocampo de las fracciones citoesqueleto-membranal y citosólica, diluida en 50 µl de solución de bicarbonato de sodio 120 mM, pH 9.6, y se analizaron por cuadruplicado.

Se realizó una curva estándar con actina pura de músculo de bovino (*actin from bovine muscle*, Sigma) con las siguientes concentraciones: 0.0, 0.01, 0.03, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1 y 0.2 µg/50 µl en solución de bicarbonato de sodio, 120 mM, pH 9.6, simultánea a la determinación de actina-G y actina-F para cada uno de los grupos experimentales.

Las muestras se dejaron en la placa durante toda la noche a 4 °C. Después de bloquear las muestras con albúmina sérica bovina libre de globulinas al 1% (1 hora a temperatura ambiente), se adicionó a los pozos el anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-actina (AC-40 Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) en una dilución 1:10 000 (2 hr a temperatura ambiente). Después se incubaron las muestras con un anticuerpo antirratón biotinilado (Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, RU) en una dilución 1:10 000 (1 hr a 37 °C). Se agregó conjugado estreptavidina-peroxidasa (Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, RU) a una concentración de 1 µg/ml, y los pozos se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min. La reacción se hizo visible con el sustrato o-fenilendiamina dihidrocloruro (OPD) y se

terminó con la adición de ácido sulfúrico. Se cuantificó la densidad óptica de las fracciones de actina citosólica y citoesqueleto-membranal determinadas en cada animal y en cada grupo experimental en un lector de placas multipozos (Benchmark, Biorad, Hercules, California, EUA) a 490 nm.

VI.5.Determinación de tubulina por *Western Blot*

Las proteínas de la fracción citoesqueleto-membranal y citosólica (5 µg) se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) al 10% (Laemmli, 1970).

VI.5.1. Preparación de los geles

Para el gel concentrador al 4% se adicionó acrilamida/bis acrilamida 30%, dodecilsulfato sódico (SDS) al 10%, persulfato de amonio al 10%, tetrametiletilenediamino (TEMED), solución amortiguadora tris-HCL 500 mM (pH 6.8) y agua. Para el gel separador al 10% se adicionó acrilamida/bis acrilamida 30%, SDS al 10%, persulfato de amonio al 10%, TEMED, solución amortiguadora tris-HCL 1500 mM (pH 8.8) y agua. (Véase la tabla I).

Tabla I. Gel SDS-PAGE al 10%.

	Agua milliQ (ml)	Acrilamida/ bis 30% (ml)	Solución amortiguadora gel (ml)	SDS 10% (ml)	Persulfato de amonio al 10%	TEMED
Gel concentrador (4%)	6.1	1.3	2.5 (500 mM tris-HCl pH 6.8)	0.1	50 μ l	10 μ l
Gel Separador (10%)	4.1	3.3	2.5 (1500 mM tris-HCl, pH 8.8)	0.1	50 μ l	5 μ l

VI.5.2 Separación de proteínas por electroforesis

Las proteínas de la fracción citosólica y la citoesqueleto-membranal se separaron por electroforesis unidimensional con el método de Laemmli (Laemmli, 1970). Brevemente, las muestras se diluyeron 1:1 con solución amortiguadora de Laemmli (500 mM de tris HCl, pH 6.8, glicerol, SDS al 10%, azul de bromofenol al 0.5% y agua). Por cada 950 μ l de solución amortiguadora de Laemmli se adicionó 50 μ l de beta-mercaptoetanol. Se calentaron las muestras a 95 °C durante 2 min y se procedió a separarlas en los geles de poliacrilamida al 10% (Laemmli, 1970). Las muestras se corrieron durante 20 min en una solución amortiguadora de corrida 1X, pH 8.3 (tris base 25 mM, glicina 192 mM y 0.1 % SDS) a 200 V, 120 mA y potencia 24, en una cámara de electroforesis miniprotean 3 Bio-

Rad. Una vez separadas las proteínas en el gel, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μ m en un minitransblot (Bio-Rad) con buffer de transferencia (tris base 25 mM, glicina 192 mM, 20% de metanol) durante 90 min en las siguientes condiciones: 100 V, 350 mA y potencia 50.

VI.5.3. Inmunodetección de la proteína tubulina beta

La tubulina se identificó en la membrana de nitrocelulosa con el anticuerpo específico antitubulina beta, y la detección de las bandas de proteína se realizó con el método de quimioluminiscencia incrementado (ECL, por sus siglas en inglés). Brevemente, una vez finalizada la transferencia, las membranas se bloquearon con solución amortiguadora tris salina (TBS; tris 50 mM, pH 7.5, NaCl 200 mM) y leche sin grasa al 5% durante 1 hr a temperatura ambiente. Posteriormente las membranas se incubaron toda la noche a 4 °C con el anticuerpo monoclonal de ratón antitubulina beta (Invitrogen, California, EUA) a una dilución de 1:500 en TBS y leche al 0.2%. Después de los lavados con TBS y *tween* 20 (TTBS, 0.05%; 3 lavados de 5 min c/u), se adicionó el anticuerpo secundario antirratón hecho en cabra acoplado a peroxidasa de rábano (HRP, Jackson ImmunoResearch) a una concentración de 1:10 000 con TBS durante 1 hora y media. Se lavaron entonces las membranas con TTBS; las bandas de

las proteínas se detectaron con el procedimiento de quimioluminiscencia (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, California, EUA). Las membranas se expusieron a placas sensibles a rayos X (Kodak, México) y se revelaron. Las imágenes se adquirieron con el densitómetro GS-800 (Bio-Rad). La tubulina globular y microtubular se cuantificó por densitometría con el software Quantity-1 (Bio-Rad).

Con el propósito de normalizar los datos, la cantidad de actina o tubulina polimerizada determinada en la fracción citoesqueleto-membranal de ratas control, *sham*, pinealectomizadas y pinealectomizadas, y tratadas con melatonina se dividió entre la cantidad de actina o tubulina determinada en la fracción citosólica (despolimerizada) en cada grupo.

VI.6. Inmunohistoquímica: Distribución de tubulina beta en el hipocampo

Los animales del grupo control, Px 12 semanas y tratados con el vehículo o la melatonina se perfundieron con 250 ml de solución amortiguadora de fosfatos salina (PBS) 1X (NaCl 1300 mM, NaH_2PO_4 30 mM, Na_2HPO_4 70 mM) y 250 ml de paraformaldehído al 4% + PBS 1X por punción intracardiaca. A continuación se extrajo el cerebro y se dejó toda la noche en paraformaldehído al 4% + PBS 1X. Después se colocó el cerebro en una solución de sacarosa

al 30%. Los cerebros se mantuvieron a -70°C hasta la realización de la inmunohistoquímica. Brevemente, los cerebros se sacaron del congelador a -70°C , se dejaron durante 10 min a temperatura ambiente y se colocaron en alcohol al 70% durante 30 min. Se sumergieron en formol al 4% durante toda la noche y se procedió a la inclusión en parafina en un *histoquinet*. Este equipo permite procesar automáticamente los tejidos para su posterior infiltración en parafina. El procedimiento consistió en la deshidratación del tejido con concentraciones crecientes de etanol (ETOH), el aclaramiento (con xilol) y la inclusión (parafina). Luego se forman los bloques de parafina y el tejido en un módulo de inclusión de parafina (Leica EG1160). Se realizaron cortes coronales de 2 micras a la altura del hipocampo (Bregma, -3.3 mm y -4.8 mm) en un microtomo (Microm) y se montaron en laminillas con poli-L-lisina al 1% (dos cortes de cerebro de rata —Bregma, -3.3 mm y -4.8 mm — y un control positivo —astrocitoma de cerebro humano— por laminilla).

Para fundir la parafina, las laminillas se colocaron en una estufa a 60°C durante al menos 30 min y un máximo de 24 hr. A continuación se incubaron las laminillas en xilol durante 5 min, xilol 30 seg, y se corrieron en el tren de hidratación (del paso 3 al paso 12)/deshidratación (del paso 12 al paso 3) que se muestra en la tabla II.

Tabla II. Tren de Hidratación/Deshidratación

58

Núm.	Solución	Tiempo
1	Xilol	5 min.
2	Xilol	30 seg.
3	ETOH abs. anhidro	30 seg.
4	ETOH abs. anhidro	30 seg.
5	ETOH 96%	30 seg.
6	ETOH 96%	30 seg.
7	ETOH 80%	30 seg.
8	ETOH 70%	30 seg.
9	ETOH 60%	30 seg.
10	ETOH 50%	30 seg.
11	Agua destilada	30 seg.
12	Agua destilada	5 min.

A continuación se inmunotñeron las rebanadas de tejido con un anticuerpo antitubulina beta y 3,3 deaminobencidina. Para el proceso de recuperación de epitopes se empleó la solución amortiguadora con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) con alto pH (Dako Cytomation, Denmark A/S, Glostrup, Dinamarca), y la aplicación de calor y presión; para llevar a cabo lo anterior se colocaron las laminillas con las rebanadas en un vaso coplin de polipropileno con solución amortiguadora con EDTA y se calentó en una olla de presión para microondas (Nordicware, Mineápolis, Minnesota) a máxima potencia (1 100 watts) durante 6 min. Enseguida, los cortes de hipocampo se lavaron 3 veces con agua destilada y se incubaron con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 0.9% durante 5 min. Después de 3 lavados con

agua destilada, las laminillas con las rebanadas se montaron en el sistema por capilaridad *coverplates* – Thermo Shandon; es un instrumento plástico que se acopla sobre un portaobjetos para inmunoteñir los tejidos con una cantidad mínima de anticuerpo—.

Inicialmente, se adicionó 100 μ l del anticuerpo primario monoclonal de ratón tubulina beta (Invitrogen, California) en una dilución de 1:100 (1 μ l de anticuerpo + 99 μ l de PBS 1X diluido en agua de ampolleta) y se incubó durante 45 min. Después de 1 lavado con PBS 1X con *tween* al 0.1% (4 min) se adicionaron 100 μ l de anticuerpo secundario biotinilado antirratón (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Baltimore Pike, West Grove, Pensilvania) en una dilución de 1:200 (1 μ l de anticuerpo + 199 μ l de PBS 1X diluido en agua de ampolleta) y se dejó incubar durante 30 min. Se realizó 1 lavado con PBS 1X con *tween* al 0.1% (4 min) y se adicionaron 3 gotas del complejo estreptavidina-peroxidasa de rábano (Dako Cytomation, Dinamarca A/S, Glostrup Denmark) y se dejó incubar durante 30 min. Luego se lavaron las rebanadas de hipocampo con PBS 1X con *tween* al 0.1% (4 min), se desmontaron las laminillas del *coverplate* y se revelaron con 3,3 deaminobencidina (DAB; Bio SB, Santa Bárbara, California). Se adicionaron 100 μ l de DAB al tejido y se supervisó la reacción al microscopio hasta que la reacción colorimétrica fuera la adecuada en el control

positivo. Los portaobjetos con las rebanadas se colocaron en una canastilla de acero inoxidable con agua corriente para la tinción con hematoxilina.

Las rebanadas de hipocampo se incubaron con hematoxilina durante 3 minutos (tinción nuclear), se lavaron 30 seg con agua corriente, se incubaron 30 seg con hidróxido de amonio, se lavaron durante 30 seg en agua corriente, y se procedió a correr los portaobjetos con los cortes de hipocampo en el tren de deshidratación (del paso 12 al paso 3). Las laminillas se dejaron secar a temperatura ambiente hasta la evaporación del alcohol en ellas; se introdujeron en xilol, se agregó resina sintética (Entellan, Merck Darmstadt, Alemania) sobre los cortes y se cubrieron con un portaobjetos. Se dejaron secar durante 24 hr. Las imágenes del hipocampo de los 3 grupos experimentales se adquirieron con una cámara de video Hitachi KP-D581 acoplada a un microscopio Olympus BH2-RFCA y se procesaron con el programa Image Pro Plus 6.0.

VI.7.Evaluación de la memoria en el laberinto radial de 8 brazos

Se privó de alimento a los animales control, *sham* y pinealectomizados y tratados con vehículo o melatonina hasta que alcanzaron 80% de su peso corporal respecto de cuando se les alimentó *ad libitum*. Una semana después se

realizó una prueba para evaluar la memoria con el laberinto radial de 8 brazos por 10 sesiones (Olton, 1977; Olton y Samuelson, 1976). El cuarto de observación tiene varias señales alrededor del laberinto para la orientación espacial, las cuales permanecieron en el mismo sitio durante todos los experimentos (figura 6). Las ratas se adaptaron al aparato por 3 días antes del comienzo de la prueba (aclimatación). En el día 1 a cada rata se le permitió explorar el laberinto individualmente por 10 min. Durante este tiempo se diseminaron los *pellets* de alimento (piezas de 3 mg de *fruit loops*) por toda la superficie de los ocho brazos. En los días 2 y 3 se colocó en la parte distal de cada brazo sólo una pieza de alimento y a cada rata se le permitió explorar el laberinto por 10 min. Para las pruebas experimentales (adquisición), se colocó a cada rata en la plataforma central y se le permitió elegir los brazos hasta que tomara y comiera las 8 piezas de alimento o transcurrieran 10 min. Se registró el tiempo para encontrar los 8 *pellets*. Las entradas a los brazos con alimento se registraron como elecciones correctas. Las re-entradas a los brazos visitados previamente durante un ensayo se definieron como errores en la memoria de trabajo. Las ratas experimentaron un total de 10 ensayos por 2 semanas. La administración de melatonina (1 mg/kg i.p.) a los animales pinealectomizados se realizó en la

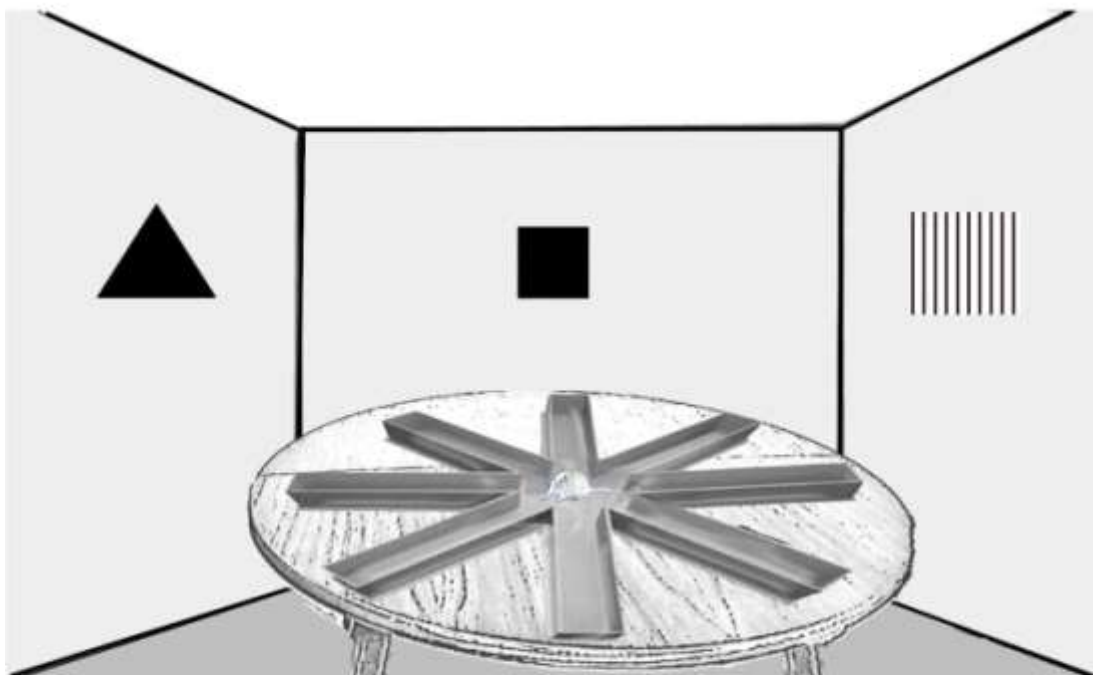


Figura 6. Cuarto de observación con señalizaciones externas y laberinto radial de 8 brazos.

fase de luz en todos los ensayos (10:00 hr), y 2 hr después se realizó la prueba de memoria. Se empleó el software ANY-Maze, sistema de video para el registro y análisis de experimentos de comportamiento. Seis horas después del último ensayo, se sacrificó a los animales por decapitación.

VI.8. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el software SigmaPlot 10.0. Los datos se analizaron por medio de la prueba t de Student. Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar de la media (SEM). Se consideró significativo un valor de $p < 0.05$.

VII.RESULTADOS

VII.1.Determinación de los niveles de la melatonina en el suero

Con el fin de establecer una asociación entre la concentración de melatonina circulante en el torrente sanguíneo y la organización del citoesqueleto en regiones específicas del cerebro, se determinaron los niveles de esta indolamina en el suero y de la cantidad relativa de microtúbulos y microfilamentos en el hipocampo. Las muestras de suero y los homogeneizados de hipocampo se obtuvieron de ratas mantenidas en un régimen de fotoperiodo. Un grupo de animales se sacrificó en la fase de oscuridad (4:00 hr), mientras que el otro grupo se sacrificó en la fase luminosa (14:00 hr).

Los niveles de la melatonina en el suero se determinaron con la técnica de ELISA competitivo. Para calcular la concentración de melatonina en las muestras sanguíneas se realizó, primero, una curva estándar con concentraciones conocidas de la indolamina, en un margen de 3 a 300 pg/ml. Los resultados se ajustaron con la ecuación de la recta y se determinó un coeficiente de correlación lineal de 0.99. Los datos indican que el margen de concentraciones entre 10 y 250 pg/ml se ubica dentro de la recta trazada con los resultados que se

obtuvieron con las concentraciones conocidas de melatonina y en el margen de sensibilidad descrito para la detección de esta indolamina en fluidos biológicos (figura 7.1).

La figura 7.2 muestra la concentración de la melatonina determinada en el suero obtenida a las 4:00 hr en la fase de oscuridad y a las 14:00 hr en la fase de luz. La concentración de melatonina mostró un incremento de 98% en las muestras obtenidas a las 4:00 hr en la fase de oscuridad, en contraste con la concentración de la indolamina determinada en la fase de luz, que fue menor a los 40 pg/ml (figura 7.2), de acuerdo con lo descrito en la literatura (Sánchez *et al.*, 2004).

VII.2.Relación de tubulina y actina polimerizada/despolimerizada

En las células, la tubulina y la actina adoptan dos tipos de conformaciones tridimensionales en el espacio: globular y polimerizada. En el citosol, la forma predominante es la globular, en tanto que en el citoesqueleto la forma polimerizada es la preponderante. Por lo anterior, para determinar la cantidad relativa de cada una de estas proteínas en sus dos conformaciones se separó el citosol de la fracción citoesqueleto-membranal por centrifugación diferencial. A continuación se

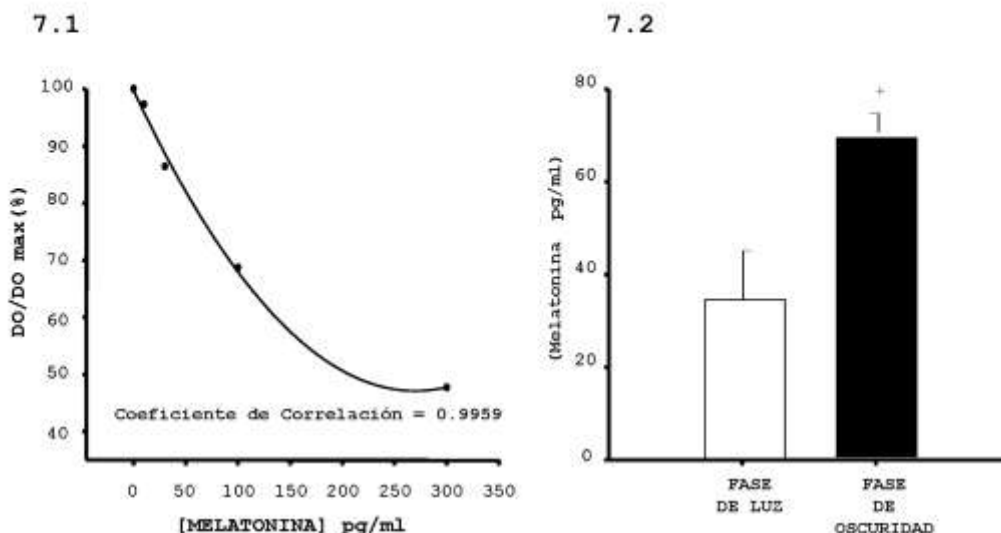


Figura 7. Determinación de la concentración de la melatonina en el suero de roedores sometidos a un régimen de fotoperiodo. La cuantificación de melatonina se realizó con una curva estándar elaborada con concentraciones conocidas de la indolamina en un margen de 3 a 300 pg/ml. Los datos se ajustaron con la ecuación de la recta (figura 7.1). La figura 7.2 muestra la concentración de melatonina en el suero de las ratas (n = 5) sacrificadas a las 14:00 hr, en la fase luminosa (□) o a las 4:00 hr, en la fase de oscuridad (■). Los resultados representan la media \pm S.E.M de un experimento realizado por cuadruplicado. +p < 0.05.

desnaturalizaron las proteínas de cada una de estas fracciones y se separaron en geles de poliacrilamida. La actina y la tubulina se caracterizaron por su movilidad relativa en geles de poliacrilamida al 10% y mediante su reconocimiento con anticuerpos específicos por medio de la técnica *Western Blot*.

En la figura 8 (Panel A) se muestra la movilidad relativa (R_f = distancia recorrida de la proteína X en el gel entre distancia total recorrida por el marcador de frente del gel) de 5 proteínas de peso molecular conocido. Como se muestra en la figura 8 (Panel A), la relación entre el peso molecular y los R_f fue lineal para

el margen de pesos moleculares entre 40 000 y 100 000 daltones. Los valores de R_f de la actina y de la tubulina —determinados por extrapolación— fueron de 0.52 y 0.42, y su peso molecular, de 43 000 y 50 000 daltones, respectivamente.

En la figura 8 (Panel B) A-B muestra el patrón de proteínas de la fracción citosólica y de la fracción citoesqueleto-membranal. En el carril C se ve la banda de actina en la fracción citosólica reconocida con un anticuerpo específico. En tanto, en el carril D aparece la banda de actina en la fracción citoesqueleto-membranal, más abundante que en la fracción citosólica. En los carriles E y F está la banda de la tubulina presente en las fracciones citosólica y la citoesqueleto-membranal, reconocidas con un anticuerpo específico. Como se observa, alrededor de 50% de la tubulina está presente en cada una de estas fracciones.

La relación entre la cantidad relativa de actina y de tubulina polimerizada en los microfilamentos y microtúbulos, respectivamente, y la de cada una de estas proteínas en su conformación globular (despolimerizada), se determinó en las ratas mantenidas en un régimen de fotoperiodo. Los resultados se muestran en la figura 9.1.

En la fase de oscuridad se encontró un incremento en la relación de actina polimerizada/despolimerizada de 74% respecto del cociente calculado en las muestras de

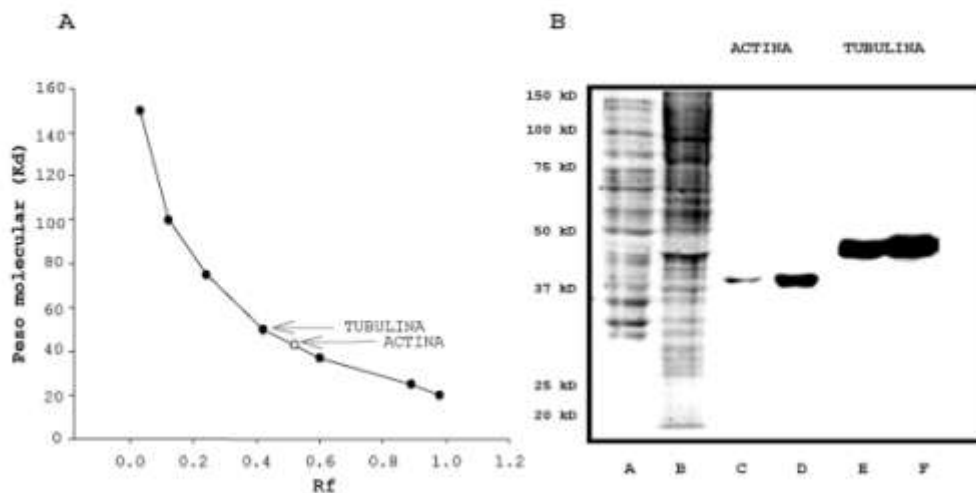


Figura 8. Caracterización de la tubulina y la actina. Las ratas Wistar mantenidas en un régimen de fotoperiodo se sacrificaron en la fase de luz. El hipocampo se removi6, se disect6 y se homogeneiz6 como se describe en la Metodologí de este trabajo. La fracci6n citoesqueleto-membranal se separ6 de la citos6lica por centrifugaci6n diferencial. En el Panel A se muestra la movilidad relativa de varios marcadores proteicos de peso molecular conocido. Las flechas seíalan los pesos moleculares determinados para actina y tubulina. En el Panel B se muestra un gel representativo en donde se separaron las proteínas de la fracci6n citoesqueleto-membranal (B,D,F) y de la fracci6n citos6lica (A,C,E). Las bandas de proteína se tiñeron con azul de Coomassie (A,B). La actina (C,D) y la tubulina (E,F) se identificaron con anticuerpos específicos, y la detecci6n de las bandas se realiz6 por el método de quimioluminiscencia incrementado.

hipocampo obtenidas de las ratas sacrificadas en la fase luminosa; por otra parte, no se encontraron diferencias significativas en la relaci6n de tubulina polimerizada/despolimerizada determinada en el hipocampo obtenido en la fase de oscuridad respecto de la fase de luz. En la figura 9.2 se muestra una representaci6n gráfca de los porcentajes de cada una de las conformaciones de la actina y de la tubulina.

Se asumi6 que 100% de la tubulina o de la actina total es la suma de la conformaci6n globular y de la polimerizada. Los resultados mostraron que la cantidad de

microfilamentos (actina polimerizada) aumentó 14% en la fracción citoesqueleto-membranal en el hipocampo de las ratas sacrificadas a las 4:00 hr en la fase de oscuridad (figura 9.2), mientras que sólo se observó un ligero incremento de 6% en la cantidad de microtúbulos (tubulina polimerizada) en esta fracción, en comparación con la fracción citoesqueleto-membranal de ratas sacrificadas a las 14:00 hr en la fase luminosa (figura 9.2). Estos resultados sugieren que la organización del citoesqueleto cambia en sincronía con el fotoperiodo, y que está relacionada con los niveles de la melatonina circulante en el suero en la fase de oscuridad.

Está documentado que la pinealectomía causa una disminución en los niveles de melatonina en el plasma (Lewy *et al.*, 1980). Por esta razón, y con el fin de explorar la participación de la melatonina en los cambios observados en la organización del citoesqueleto, se pinealectomizó e inyectó a las ratas intraperitonealmente con el vehículo o con la melatonina. Después de una semana de tratamiento se obtuvieron las fracciones citoesqueleto-membranal y la citosólica; la primera fracción contiene la forma polimerizada de la actina y de la tubulina, y la segunda, la de la forma globular. En las figuras 10, 11, 12 y 13 se muestran la cantidad de actina y tubulina polimerizadas en los microfilamentos y los microtúbulos, respectivamente, en las ratas no

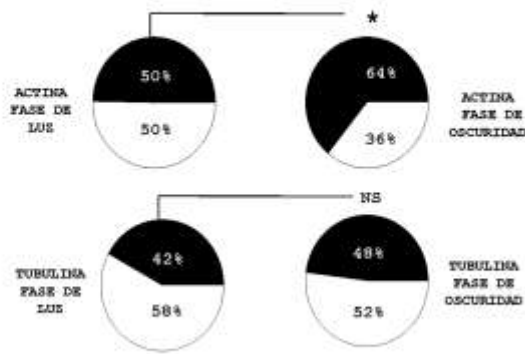
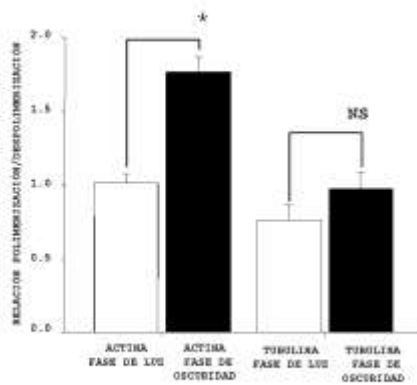


Figura 9. Relación de la actina y tubulina polimerizada/despolimerizada en el hipocampo de ratas mantenidas en un régimen de fotoperiodo. Se mantuvo a las ratas en ciclos de luz/oscuridad 12/12 hr, como se describe en la sección Métodos. Las ratas se sacrificaron a las 14:00 hr (fase de luz) y 4:00 hr (fase de oscuridad); se disectó el hipocampo y se separaron las fracciones citoesqueleto-membranal y citosólica. El panel 9.1 muestra la relación de la cantidad relativa de la actina y la tubulina polimerizada respecto de la cantidad relativa de cada una de estas proteínas en su forma globular (despolimerizada), determinada por la técnica de ELISA o por Western Blot, respectivamente. Los resultados representan la media \pm el error estándar de cinco determinaciones realizadas por duplicado. El panel 9.2 muestra la distribución (porcentajes) de las fracciones citosólicas (blanco) y citoesqueleto-membranal (negro) obtenidas de ratas sacrificadas durante la fase de luz o la de oscuridad. Los asteriscos representan diferencias significativas respecto del control. * $p < 0.001$.

pinealectomizadas (control, *sham*), pinealectomizadas, y pinealectomizadas e inyectadas diariamente con 1 mg/kg de melatonina durante 7 días, y sacrificadas 6 hr después de la última inyección.

Se observó que la relación de la actina polimerizada/despolimerizada en el hipocampo de las ratas control fue similar a la obtenida en las ratas *sham*; sin embargo, en las ratas pinealectomizadas, la relación de la actina polimerizada/despolimerizada disminuyó 41% (figura 10). En contraste, las ratas pinealectomizadas

tratadas con la melatonina mostraron un incremento de 298% en la relación de actina polimerizada/despolimerizada respecto de las ratas pinealectomizadas (figura 10). Este valor fue semejante al obtenido en los animales intactos sacrificados durante la fase de oscuridad (figura 9.1), pero cabe notar que no se observaron diferencias significativas entre el grupo de los animales pinealectomizados y los animales pinealectomizados e inyectados con el vehículo. En la figura 11 se representan de manera gráfica los porcentajes de la actina polimerizada y de la actina globular. Se asumió que 100% de la actina es la suma de estas dos conformaciones. La cantidad de los microfilamentos constituidos por la actina polimerizada incrementó 30% en la fracción citoesqueleto-membranal en el hipocampo de las ratas pinealectomizadas y tratadas con la melatonina, en comparación con las ratas pinealectomizadas (figura 11).

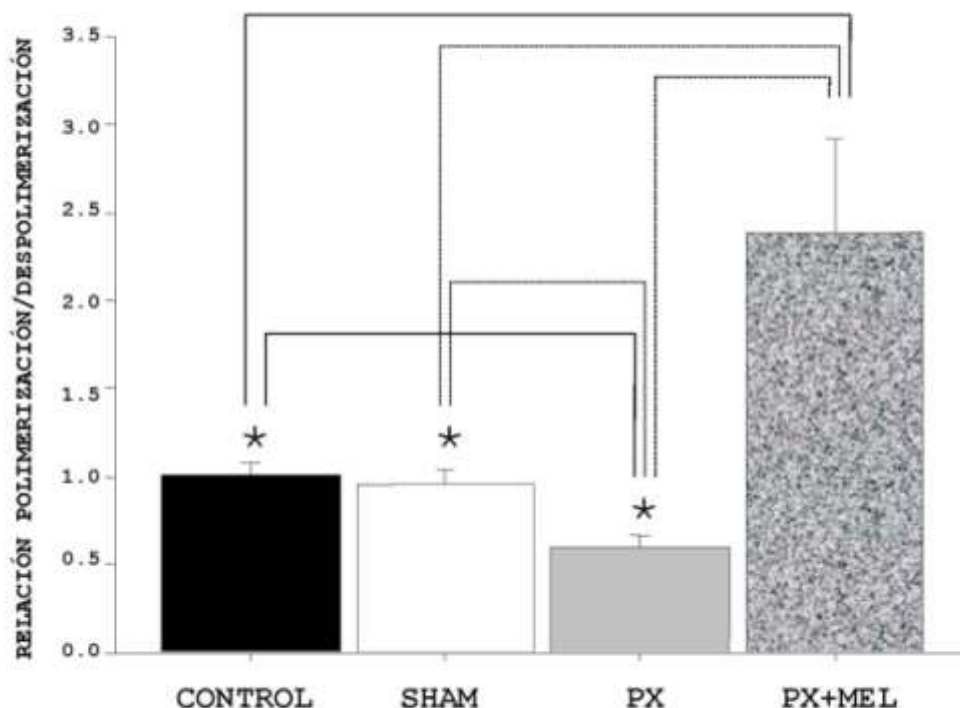


Figura 10. Efecto de la melatonina sobre la organización de los microfilamentos en ratas pinealectomizadas. Se sacrificó (16:00 hr) a las ratas control, sham, pinealectomizadas (PX) o pinealectomizadas y tratadas con 1 mg/kg de melatonina (PX+MEL). El hipocampo se disectó y se obtuvieron las fracción citoesqueleto-membranal y citosólica como se describe en la sección Métodos. La organización de los microfilamentos se estimó mediante la cuantificación de la actina polimerizada en la fracción citoesqueleto-membranal. Los datos se normalizaron dividiéndolos entre la cantidad de actina globular determinada en la fracción citosólica. Los resultados representan la media \pm el error estándar. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con una $p < 0.05$.

En la figura 12 se muestra el efecto de la melatonina en la organización de los microtúbulos en ratas pinealectomizadas. La cantidad relativa de tubulina globular y tubulina polimerizada se determinó en la

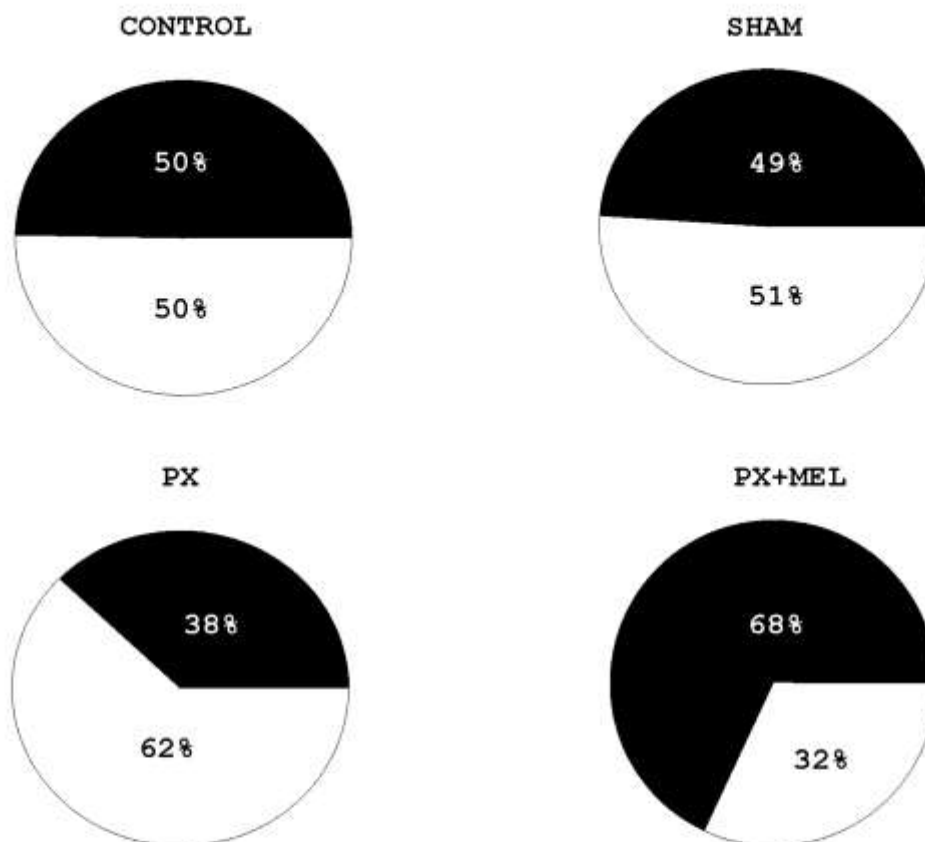


Figura 11. Efecto de la melatonina sobre la organización de los microfilamentos en ratas pinealectomizadas. Se sacrificó a las ratas (16:00 hr) control, *sham*, pinealectomizadas (PX) o pinealectomizadas y tratadas con 1 mg/kg de melatonina (PX+MEL). El hipocampo se disectó y se obtuvieron las fracciones citoesqueleto-membranal y citosólica como se describe en la sección Métodos. Los niveles de actina se determinaron con la técnica de ELISA. Los resultados representan la proporción en porcentaje de la actina citosólica (blanco) y de la actina polimerizada (negro).

fracción citosólica y en la citoesqueleto-membranal, respectivamente, obtenidas del hipocampo de ratas control, *sham*, pinealectomizadas, y pinealectomizadas y tratadas con melatonina por una semana. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la relación de la tubulina polimerizada/despolimerizada determinada en las ratas *sham* y control (no

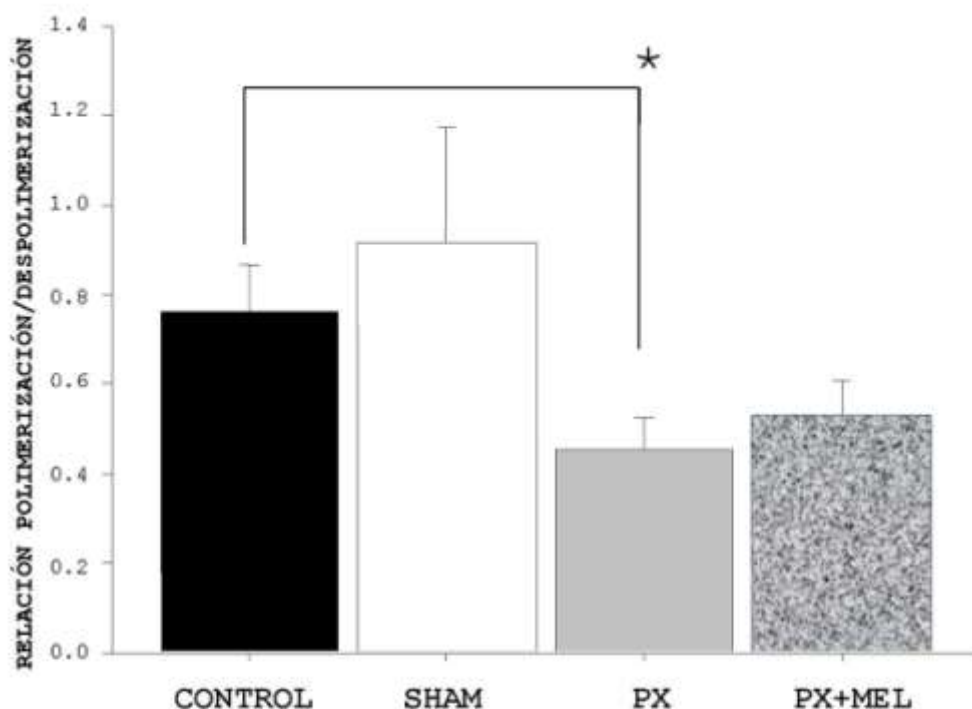


Figura 12. Efecto de la melatonina sobre la organización de los microtúbulos en ratas pinealectomizadas. Se sacrificó a las ratas (16:00 hr) control, sham, pinealectomizadas (PX) o pinealectomizadas y tratadas con 1 mg/kg de melatonina (PX+MEL). El hipocampo se disectó y se separaron las fracciones citoesqueleto-membranal (polimerizada) y citosólica. Los resultados representan la media \pm el error estándar de la relación de tubulina polimerizada/despolimerizada ($n = 5$). El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas con una $p < 0.05$.

pinealectomizadas). Sin embargo, la relación de la tubulina polimerizada/despolimerizada obtenida en las ratas pinealectomizadas disminuyó 41% en comparación con las ratas control (figura 12). Las ratas pinealectomizadas tratadas con melatonina por 7 días mostraron un incremento en la relación de tubulina polimerizada/despolimerizada, aunque no fue estadísticamente diferente respecto de los valores obtenidos en las ratas pinealectomizadas (figura 12).

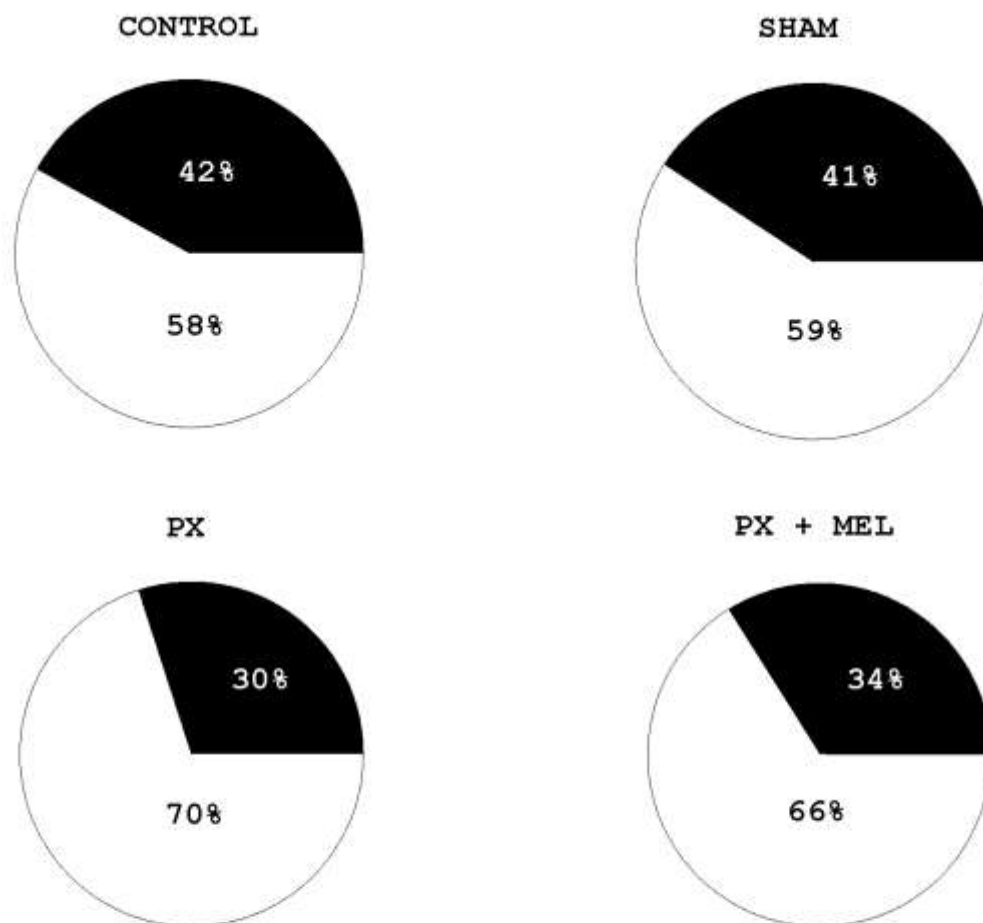


Figura 13. Efecto de la melatonina sobre la organización de los microtúbulos en ratas pinealectomizadas. Se sacrificó a las ratas (16:00 hr) control, sham, pinealectomizadas (PX) o pinealectomizadas y tratadas con 1 mg/kg de melatonina (PX+MEL). El hipocampo se disectó y se obtuvieron las fracciones citoesqueleto-membranal y citosólica como se describe en Métodos. Los niveles de tubulina se determinaron con la técnica de Western Blot. Los resultados representan la proporción en porcentaje de la tubulina citosólica (blanco) y de la tubulina polimerizada (negro).

En la figura 13 se muestra una representación gráfica de los porcentajes de la tubulina polimerizada y de la tubulina globular determinados en la fracción citoesqueleto-membranal y en la citosólica. Se asumió que 100% de la tubulina es la suma de las dos conformaciones. La proporción de la tubulina presente en la fracción citoesqueleto-membranal en las ratas pinealectomizadas

disminuyó 12% en comparación con las ratas control (figura 13), mientras que se incrementó 4% en los animales pinealectomizados y tratados con melatonina (figura 13). Los datos indican que en las ratas pinealectomizadas disminuye la cantidad de actina y de tubulina estructurada en microfilamentos y microtúbulos, respectivamente, y que el tratamiento con melatonina reestablece la organización de estos elementos del citoesqueleto.

VII.3.Localización de la tubulina beta en el hipocampo

Con el propósito de estudiar la organización de los microtúbulos en el hipocampo de animales que presentan niveles disminuidos de melatonina, se realizó la inmunohistoquímica de la tubulina beta. La detección se realizó en rebanadas de hipocampo obtenido de animales no pinealectomizados (control), y pinealectomizados y tratados con el vehículo o con la melatonina. Se observó la distribución de la inmunorreactividad de tubulina beta especialmente en el área CA1 del hipocampo en todos los grupos (figura 14). El patrón de tinción de esta proteína se encontró sobre todo en los procesos celulares. Se descubrió que la intensidad de la reacción fue mayor en los microtúbulos presentes a lo largo de los procesos celulares en las ratas control y en las ratas pinealectomizadas y tratadas con melatonina, a diferencia

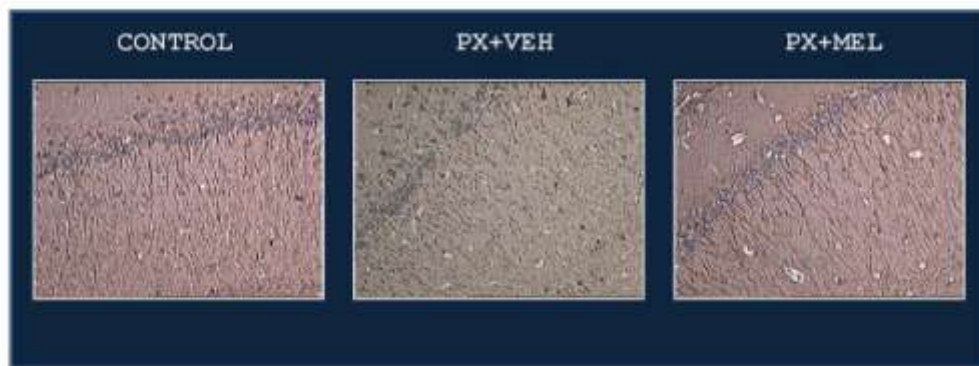


Figura 14. Efecto de la melatonina sobre la distribución de la tubulina en el hipocampo de ratas pinealectomizadas. Se perfundió por punción intracardiaca a las ratas control, pinealectomizadas y tratadas 12 semanas después con vehículo (PX+VEH) o con melatonina (1 mg/kg; PX+MEL). Después se rebanó el cerebro en secciones coronales al nivel del hipocampo (Bregma, -3.3 mm). La tubulina se tiñó con la técnica de inmunohistoquímica, con un anticuerpo específico anti-tubulina beta. La figura muestra imágenes representativas de las secciones coronales del área CA1 de la región hipocampal de las ratas control, PX+VEH y PX+MEL teñidas con el anticuerpo que reconoce a los microtúbulos. Se observan los núcleos teñidos en color azul y los protofilamentos de tubulina en color marrón oscuro. Amplificación 40X.

de los animales pinealectomizados y tratados con el vehículo, en los cuales la inmunorreactividad de la proteína se observó en forma segmentada en los procesos (figura 14). Los animales pinealectomizados y tratados con melatonina presentaron microtúbulos más largos, en concordancia con el incremento en la cantidad de tubulina polimerizada observada en las mismas condiciones.

VII.4.Cambios en la memoria espacial en el laberinto radial de 8 brazos

Con el objetivo de determinar si la disminución en la concentración de la melatonina y los cambios en la

organización del citoesqueleto se asocian a modificaciones de la memoria, se realizó una prueba de memoria de trabajo espacial en un laberinto radial de ocho brazos con los animales control sin pinealectomizar y en los pinealectomizados tratados con el vehículo o con la melatonina (1 mg/kg) durante una semana.

VII.4.1.Errores en la memoria de trabajo espacial

La evaluación de la memoria de trabajo espacial se realizó con el laberinto radial de 8 brazos. Una semana antes de realizar la prueba se controló la ingesta de alimento y se mantuvo a los animales en 80% de su peso corporal. La tarea consistió en 3 sesiones de aclimatación (posteriormente, dos días sin entrenamiento) y 10 sesiones de adquisición (cinco sesiones de adquisición, dos sesiones sin entrenamiento y, por último, cinco sesiones de adquisición). Durante la prueba el animal tenía que entrar en todos los brazos y comer el *pellet* que estaba al final de ellos. Se consideró un error en la memoria de trabajo espacial si el animal volvía a entrar a un brazo ya visitado, y se cuantificó como 10 errores en la memoria de trabajo si el animal no entraba en alguno de los brazos. En los grupos de animales pinealectomizados a los cuales se les inyectó vehículo o melatonina, la administración se realizó durante 7 días —en las últimas 5 sesiones y dos días

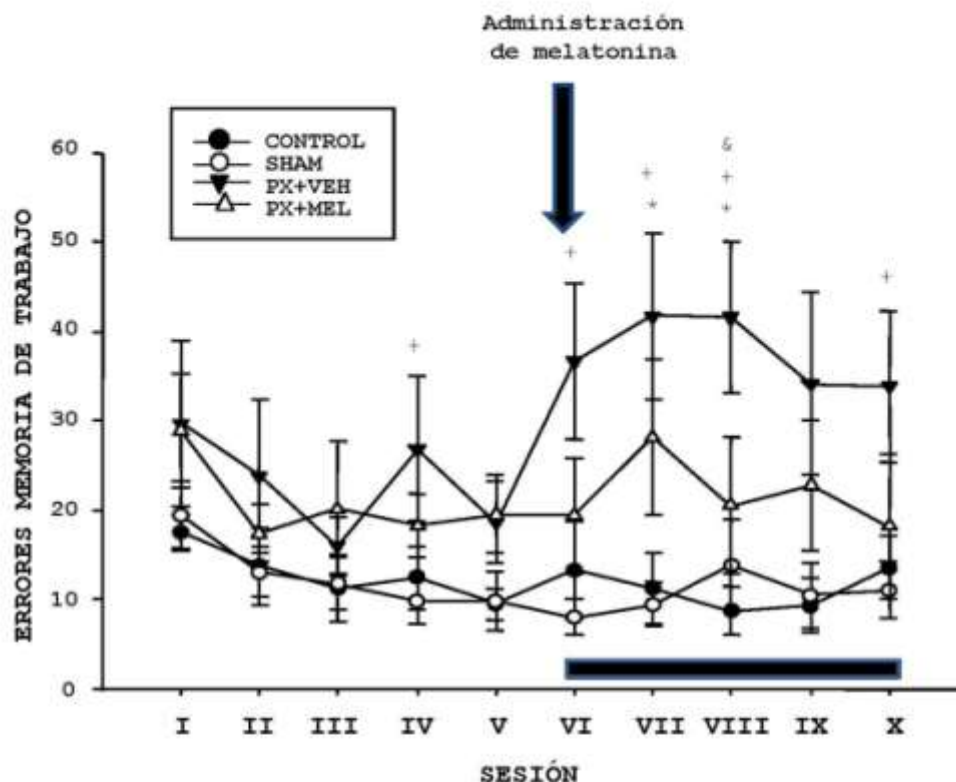


Figura 15. Efecto de la pinealectomía y el tratamiento posterior con melatonina en la memoria de trabajo. Después de tres meses de la extracción de la glándula pineal a ratas, se evaluaron los errores en la memoria de trabajo en animales tratados con melatonina en el laberinto radial de 8 brazos. Los resultados representan la media \pm error estándar de los errores en la memoria de trabajo en los animales control, sham, pinealectomizados y tratados con vehículo (PX+VEH), y pinealectomizados e inyectados con melatonina (1 mg/kg; PX+MEL) durante un periodo de 10 días (sesiones I a X), $p < 0.05$: *control vs PX+VEH; + sham vs PX+VEH; & PX+VEH vs PX+MEL.

previos-, y la prueba se realizó 2 hr después de la administración.

Después de un periodo de entrenamiento de 3 días se observó un incremento en el número de errores en la memoria de trabajo del grupo de ratas pinealectomizadas y tratadas con vehículo en las sesiones VII (270%) y VIII (375%) comparadas con el grupo control; en las sesiones

IV (173%), VI (357%), VII (344%), VIII (201%) y X (208%) en comparación con el grupo *sham*; y en la sesión VIII (103%) en comparación con los animales pinealectomizados y tratados con la melatonina (figura 15).

El número de errores en la memoria de trabajo se agrupó en dos bloques: en el bloque 1 se agruparon los resultados obtenidos de la sesión I a la V con los animales control, los *sham* y los pinealectomizados antes de la administración del vehículo o la melatonina; en el bloque 2 se agruparon los resultados obtenidos de la sesión VI a la X con los animales control, los *sham* y los pinealectomizados a los cuales se les administró el vehículo o la melatonina. En el bloque 1 se observó que los animales pinealectomizados mostraron un incremento significativo en el número de errores en la memoria de trabajo en comparación con el grupo control (69%) y el grupo *sham* (71%) ($p < 0.05$); por otra parte, en el bloque 2 se observa que los animales pinealectomizados y tratados con el vehículo mostraron un mayor número de errores en la memoria de trabajo en comparación con el grupo control (235%), *sham* (257%) y los animales pinealectomizados tratados con melatonina (72%) ($p < 0.001$) (figura 16).

En cuanto a los animales pinealectomizados y tratados con la melatonina, éstos mostraron un mayor número de errores en la memoria de trabajo en comparación

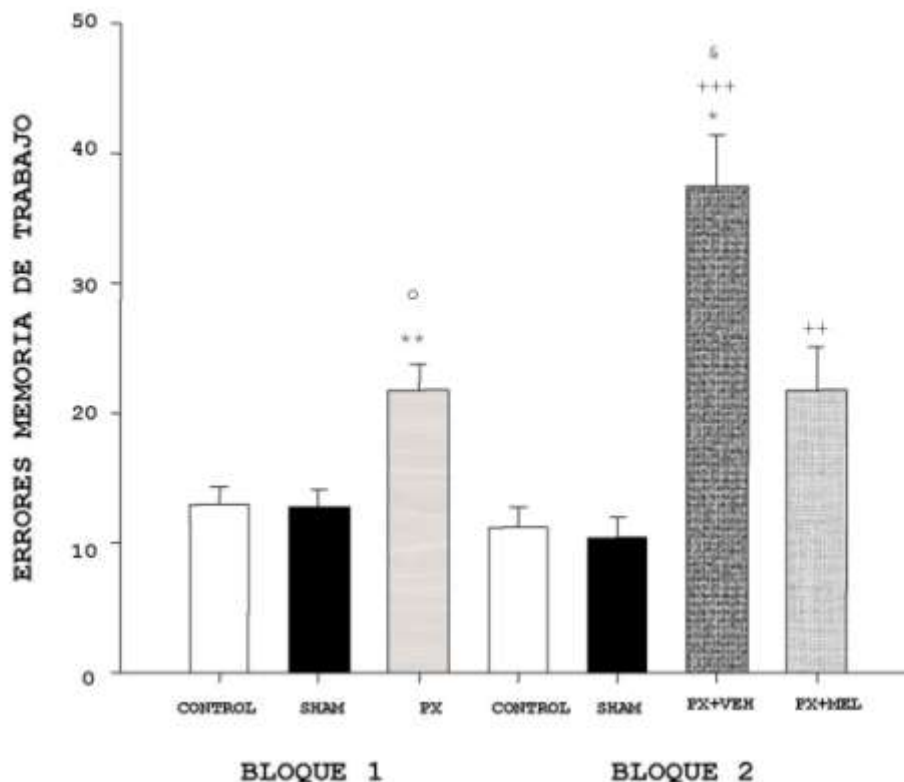


Figura 16. Efecto de la pinealectomía y de la melatonina en la memoria de trabajo. Después de tres meses de la extracción de la glándula pineal a las ratas, se evaluaron los errores en la memoria de trabajo en los animales pinealectomizados y tratados con vehículo o melatonina en el laberinto radial de 8 brazos. Los resultados representan la media \pm error estándar de una n de cinco, de los errores en la memoria de trabajo determinada en los animales control, sham, pinealectomizados (PX), pinealectomizados y tratados con vehículo (PX+VEH), y pinealectomizados e inyectados con melatonina (1 mg/kg; PX+MEL). Los resultados se muestran en dos bloques: Bloque 1, sesiones I a V (antes de la administración de vehículo o melatonina), y Bloque 2, sesiones VI a X (en las que se administró vehículo o melatonina). Se observaron diferencias estadísticamente significativas en el Bloque 1: $p < 0.05$: **control vs PX; °sham vs PX; en el Bloque 2: $p < 0.05$: ++sham vs PX+MEL. $p < 0.001$: *control vs PX+VEH; +++sham vs PX+VEH; & PX+VEH vs PX+MEL.

con los animales del grupo sham (106%) ($p < 0.05$) (figura 16).

VII.4.2. Tiempo para completar la tarea en el laberinto radial de 8 brazos

Cada una de las 3 sesiones de aclimatación y 10 sesiones de adquisición tenía una duración total de 10 min. Sin

embargo, la sesión se consideraba finalizada si el animal completaba la entrada a todos los brazos y comía los 8 *pellets*. Se observó que el tiempo en el cual los animales encontraron los 8 *pellets* aumentó en los animales pinealectomizados y tratados con el vehículo en la sesión VIII (43%) en comparación con el grupo control ($p < 0.05$), y en las sesiones IV (39%), VI (59%), VII (67%) y VIII (44%) en comparación con el grupo *sham* ($p < 0.05$) (figura 17). Los animales del grupo *sham* disminuyeron el tiempo para finalizar la prueba en la sesión X (30%) en comparación con el grupo control ($p < 0.001$), y en la sesión VII (35%) en comparación con el grupo de los animales pinealectomizados y tratados con melatonina ($p < 0.05$) (figura 17).

Los resultados del tiempo para completar la prueba se agruparon en dos bloques: en el bloque 1 se agruparon los resultados de la sesión I a la V con los animales control, los *sham* y los pinealectomizados antes de la administración del vehículo o la melatonina. En el bloque 2 se agruparon los resultados en las sesiones VI a X con los animales control, los *sham* y los pinealectomizados a los cuales se les administró el vehículo o la melatonina.

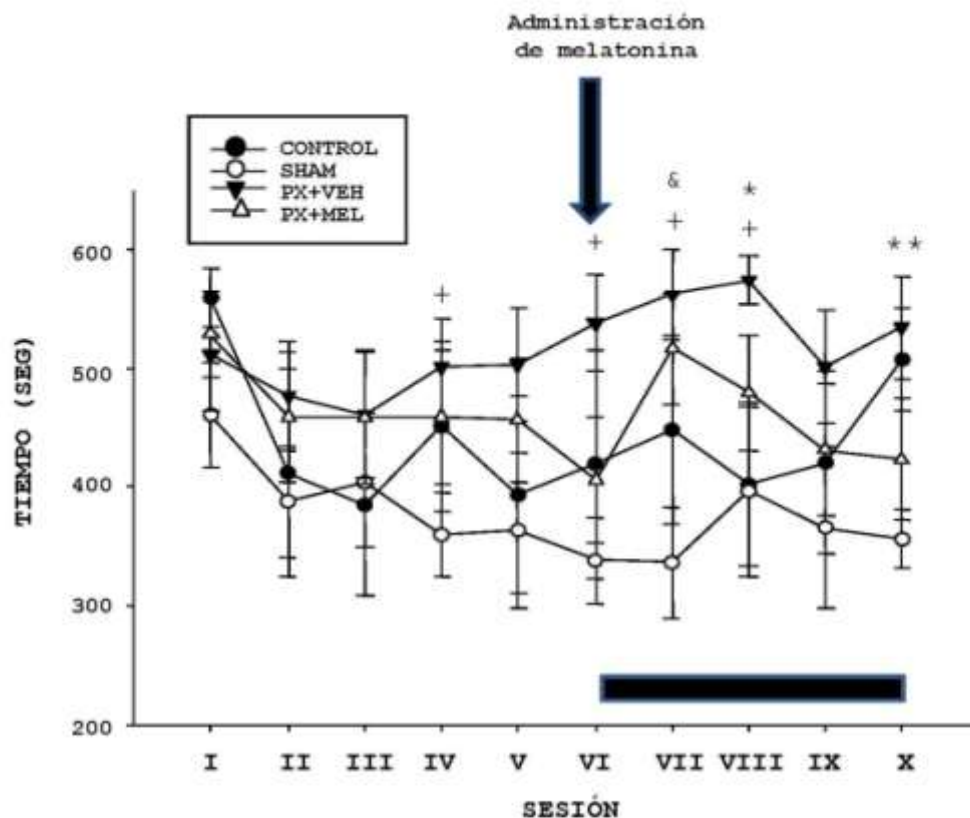


Figura 17. Efecto de la melatonina sobre el tiempo para completar la prueba de memoria de trabajo en animales pinealectomizados. Se evaluó a los animales a los cuales se les extrajo la glándula pineal tres meses después y se determinó el tiempo para completar la prueba de memoria de trabajo en el laberinto radial de 8 brazos. Los resultados representan la media \pm error estándar del tiempo en segundos determinado en cinco animales de cada grupo: control, sham, pinealectomizados y tratados con vehículo (PX+VEH), y pinealectomizados e inyectados con melatonina (1mg/kg; PX+MEL) durante un periodo de 10 días (sesiones I a X); $p < 0.05$: *control vs PX+VEH; **control vs sham; +sham vs PX+VEH; & sham vs PX+MEL.

En el bloque 1 se observó que los animales pinealectomizados se tardaron más en encontrar los 8 pellets en comparación con los del grupo sham (25%) ($p < 0.001$) (figura 18). En el bloque 2, los animales pinealectomizados y tratados con el vehículo se tardaron más en finalizar la prueba en comparación con los del grupo control (23%), el grupo sham (51%) ($p < 0.001$) y

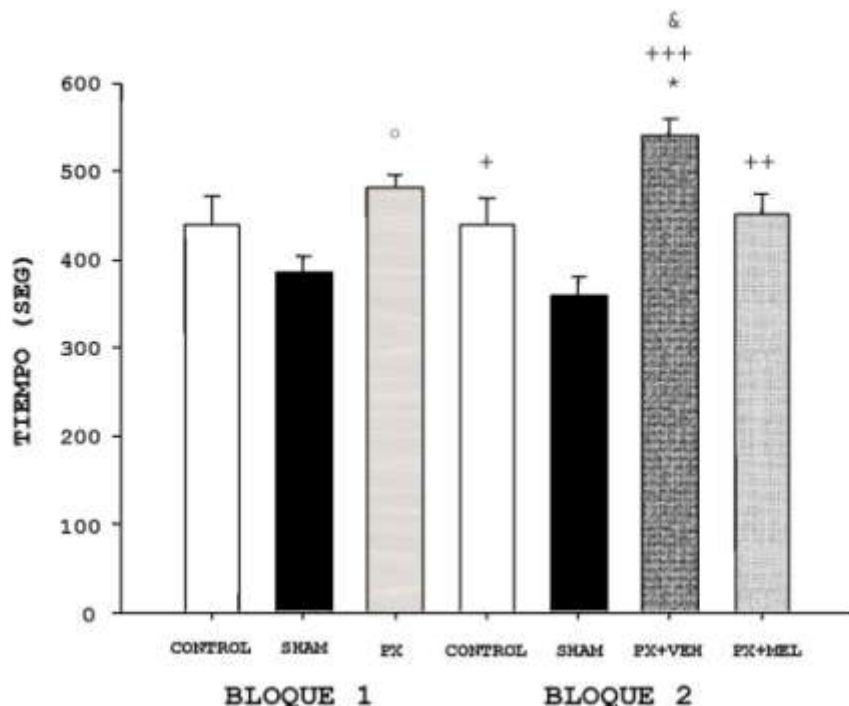


Figura 18. Efecto de la melatonina sobre el tiempo para completar la prueba de memoria de trabajo en animales pinealectomizados. Los animales control, sham y pinealectomizados y tratados con el vehículo o con la melatonina se sometieron a la prueba del laberinto radial tres meses después de la cirugía y se determinó el tiempo para completar la prueba de memoria de trabajo. Los resultados representan la media \pm error estándar del tiempo en segundos que tardaron en completar la prueba los animales control, sham, pinealectomizados (PX), pinealectomizados y tratados con vehículo (PX+VEH), y pinealectomizados e inyectados con melatonina (1 mg/kg; PX+MEL). Los resultados se muestran en dos bloques: bloque 1, sesiones I a V (antes de la administración de vehículo o melatonina), y bloque 2, sesiones VI a X (en las que se administró vehículo o melatonina). Se observaron diferencias estadísticamente significativas en el bloque 1: $p < 0.001$: o sham vs PX, y en el bloque 2: $p < 0.05$: + sham vs control; ++ sham vs PX+MEL; & PX+VEH vs PX+MEL. $p < 0.001$: * control vs PX+VEH; *** sham vs PX+VEH.

los pinealectomizados tratados con melatonina (20%) ($p < 0.05$) (figura 18). Los animales sham finalizaron más rápido la prueba en comparación con los animales del grupo control (18%) y los pinealectomizados y tratados con melatonina (21%) ($p < 0.05$) (figura 18).

Estos resultados sugieren que la administración de melatonina mejora la memoria de trabajo en los animales

pinealectomizados y disminuye el número de errores cometidos.

VIII.DISCUSIÓN

En este proyecto se demostró que la cantidad relativa de los microfilamentos en el hipocampo de ratas se incrementa durante la noche en asociación con una elevación en los niveles de melatonina. Además, se observó un decremento en la relación polimerización/despolimerización de las proteínas del citoesqueleto, actina y tubulina en ratas privadas de melatonina. En contraste, la administración de esta hormona reestableció la cantidad de actina organizada en microfilamentos, mientras que no se observaron cambios en la tubulina organizada en los microtúbulos. Por último, se encontró que los animales pinealectomizados presentan un déficit en la memoria de trabajo espacial y que el tratamiento con melatonina mejoró la ejecución de la memoria evaluada en el laberinto radial de 8 brazos.

Los pacientes con enfermedad de Alzheimer presentan una disminución en la cantidad de melatonina en el fluido cerebroespinal (Liu *et al.*, 1999), y se ha planteado que esta disminución puede considerarse un marcador temprano de la enfermedad. Además, estos pacientes presentan alteración de los ritmos circadianos (Satlin *et al.*, 1995; Van Someren *et al.*, 1996; Loewenstein *et al.*, 1982; Prinz *et al.*, 1982) y una organización anormal del citoesqueleto (Braak y Braak, 1991). Sin embargo, hay

pocos estudios que establezcan la relación entre el déficit en la liberación de la indolamina y las alteraciones en el citoesqueleto. Inicialmente, Benítez-King *et al.* (1990) mostraron el efecto de la melatonina en el citoesqueleto en células N1E-115 y MDCK. Estudios posteriores llevados a cabo por el mismo grupo y realizados en células en cultivo revelaron que las variaciones cíclicas en los niveles de esta hormona se asocian a cambios en el citoesqueleto. En las células MDCK cultivadas en ciclos de 12/12 hr con melatonina seguida por el vehículo se observó una reorganización cíclica de los microfilamentos en fibras de tensión, asociada a un incremento en el transporte de agua (Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2003). Asimismo, en células neuronales mantenidas en cultivo, la melatonina –con una concentración semejante a la que circula en el plasma durante la noche– incrementó la reorganización de los microfilamentos en conos de crecimiento y lamelas después de 6 hr de incubación (Bellon *et al.*, 2007).

Los resultados de este estudio demuestran que ocurre una variación cíclica en la organización de los microfilamentos, pues el incremento de estos componentes del citoesqueleto en el hipocampo de ratas sacrificadas en la fase de oscuridad se asocia al incremento en la concentración de la melatonina medida en el suero durante la noche. Por añadidura, se observó que la administración

de esta indolamina a ratas pinealectomizadas causa un incremento importante en el contenido de los microfilamentos en el hipocampo. Por lo tanto, estas evidencias sugieren que la organización de los microfilamentos se modula con el fotoperiodo por efecto de la señalización de la melatonina.

Se ha establecido que la despolimerización de actina ocasiona la pérdida de las espinas dendríticas así como de los receptores de glutamato en los sitios sinápticos (Allison *et al.*, 1998; Halpain *et al.*, 1998); también se ha encontrado que en el cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer hay una reducción en la densidad de las sinapsis (Davies *et al.*, 1987) así como una disminución de las espinas dendríticas en el hipocampo (DeKosky y Scheff, 1990). En consecuencia, el incremento en la polimerización de actina en el hipocampo de las ratas durante la noche (cuando los niveles de la melatonina son más altos), y después del tratamiento con esta hormona a ratas pinealectomizadas, plantea la posibilidad del empleo terapéutico de la indolamina con el objetivo de incrementar la estabilidad de los microfilamentos y retrasar la progresión de la pérdida de sinapsis.

La concentración plasmática nocturna de la melatonina incrementa la polimerización de los microtúbulos y la formación de neuritas en las células

N1E-115 (Bellon *et al.*, 2007; Huerto-Delgadillo *et al.*, 1994). En el presente estudio se observó que la privación crónica de esta hormona producida por la pinealectomía causa un decremento en la cantidad de microtúbulos, la cual se restableció de manera parcial por la melatonina. Asimismo, se encontró un ligero incremento, aunque no significativo, en la cantidad de los microtúbulos de ratas sacrificadas durante la fase de oscuridad. Por otra parte, se observó también que los animales pinealectomizados y tratados con melatonina presentan microtúbulos más largos en el área CA1 del hipocampo. Estas evidencias, y el hecho de que la pinealectomía causa un colapso en los microtúbulos asociado a la pérdida de células piramidales en las áreas CA1 y CA3 del hipocampo (Brewton *et al.*, 2001; De Butte y Pappas, 2007), apoyan la hipótesis de que esta hormona sincroniza la organización de los microtúbulos con el fotoperiodo.

Los microfilamentos están constitutivamente ensamblados y arreglados para formar fenotipos específicos que participan en procesos celulares diversos —por ejemplo, el movimiento y la dirección del cono de crecimiento— (Lodish *et al.*, 1995).

Por otro lado, hay dos tipos de microtúbulos: uno de rápido recambio, y el segundo, estable y de bajo recambio. En las células neuronales, esta población es abundante en el axón con el objetivo de mantener la

estructura de las células y los largos procesos neuronales (Cambray-Deakin y Burgoyne, 1987). Por lo tanto, el hecho de que en este trabajo se encontrara un ligero incremento en la cantidad relativa de los microtúbulos después de administrar melatonina sugiere que esta hormona afecta la población de los microtúbulos de rápido recambio, lo cual estimula la polimerización de la tubulina, como se reportó previamente, mientras que no afecta a los microtúbulos estables presentes en el hipocampo.

El citoesqueleto es una estructura celular que desempeña un papel importante en la fisiología celular (Benítez-King, 2006). Los microtúbulos forman cilios y flagelos en los organismos unicelulares, constituyen el huso mitótico durante la división celular y participan en el transporte de las vesículas de membrana en el citoplasma (Roberts, 1974). Por su parte, los microfilamentos se organizan en fibras de tensión, lamelipodios, microespiigas y filopodios que participan en la motilidad celular y en la guía del cono de crecimiento, entre otros procesos (Nozumi *et al.*, 2003).

La morfología celular y la polaridad estructural son características que dependen del citoesqueleto y que asimismo representan un papel en la fisiología celular (Cid-Arregui *et al.*, 1995). Así, las neuronas presentan una forma asimétrica y son estructuralmente polarizadas

para recibir y transmitir información por medio de procesos celulares polarizados (Setou *et al.*, 2004), razón por la cual se ha planteado la posibilidad de que las alteraciones en la organización del citoesqueleto expliquen algunas anormalidades cognitivas observadas en pacientes neuropsiquiátricos (Bianchi *et al.*, 2006).

En la enfermedad de Alzheimer, las alteraciones en la memoria son las manifestaciones más dramáticas y tempranas del padecimiento. Estos pacientes presentan un déficit en la memoria explícita (Carlesimo y Oscar-Berman, 1992), y, aunado a esto, el hipocampo, que participa en la formación y consolidación de este tipo de memoria, muestra anormalidades asociadas a la enfermedad (Geula y Mesulam, 1989). En los roedores, esta estructura cerebral está relacionada con la memoria espacial (O'Keefe y Nadel, 1979). Una prueba para evaluar la memoria de trabajo y la memoria espacial es el laberinto radial de 8 brazos (Olton *et al.*, 1978, 1979; Jarrard, 1993). En el presente trabajo se empleó esta prueba para evaluar la memoria de trabajo espacial. Los resultados indican que la pinealectomía produce un déficit en la ejecución de la tarea; no obstante, la administración de la melatonina a estos animales produce una mejora en la realización de la prueba. Otros estudios han mostrado, de manera semejante, que la disminución en los niveles de la melatonina por efecto de la pinealectomía (Ling *et al.*,

2009; Karakas *et al.*, 2011) o inducida por el haloperidol (Zhu *et al.*, 2004) produce un déficit en la memoria espacial evaluada con el laberinto acuático de Morris, y que el tratamiento con la melatonina mejora la ejecución en esta tarea (Ling *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2004).

Además, en otro estudio se demostró que el tratamiento de largo plazo con esta indolamina en ratones que presentan la neuropatología de la enfermedad de Alzheimer (ratones transgénicos a la proteína precursora amiloide y a la presenilina 1) disminuye el déficit en la memoria de trabajo medida con el laberinto radial acuático de 6 brazos (Olcese *et al.*, 2009).

Existe evidencia que indica que los efectos de la melatonina en la organización del citoesqueleto son en parte independientes de la estimulación de los receptores membranales que reciben la señal de la melatonina (Benítez-King, 2006). Se observa el rearreglo de los microfilamentos y el alargamiento de los microtúbulos producidos por la melatonina en células N1E-115 tratadas con ácido ocadáico (Benítez-King *et al.*, 2003) o con peróxido de hidrógeno (Benítez-King *et al.*, 2005) aun en presencia de concentraciones micromolares de luzindol, antagonista de los receptores de membrana a melatonina mt1 y MT2. Por otra parte, se han observado los efectos de la melatonina en la organización de los componentes del citoesqueleto en preparaciones *in situ* de

citoesqueletos desprovistos de membrana plasmática, proteínas de membrana y receptores (Lenk *et al.*, 1977; Benítez-King *et al.*, 2001). Sin embargo, otros trabajos muestran que la melatonina induce formación de neuritas en células N1E-115, y que estos cambios morfológicos son dependientes del receptor *mt1* (Bordt *et al.*, 2001).

Asimismo, los mecanismos por los cuales la melatonina causa rearrreglos en el citoesqueleto necesarios para la formación de neuritas en las células se relacionan con la estimulación de la PKC y el antagonismo de la calmodulina (Benitez-King, 2000; Huerto-Delgadillo *et al.*, 1994). El efecto de la melatonina en la polimerización de la tubulina y el alargamiento de los microtúbulos está mediado por un antagonismo de la calmodulina (Benítez-King y Antón-Tay, 1993; Huerto-Delgadillo *et al.*, 1994). Además, la administración de opiobolina, antagonista de la calmodulina, no protege a las células del daño producido por el peróxido de hidrógeno. Sin embargo, la administración conjunta de opiobolina y PMA (agonista de PKC) mostró efectos protectores similares a los obtenidos con melatonina y peróxido de hidrógeno (Benítez-King *et al.*, 2005).

El efecto de la melatonina en la reorganización del citoesqueleto implica la activación de la PKC (Benítez-King, 2006). Se ha demostrado que la melatonina causa la

reorganización del citoesqueleto en células N1E-115 (Bellón *et al.*, 2007), en células N1E-115 tratadas con peróxido de hidrógeno (Benítez-King *et al.*, 2005) y en células MDCK derivadas del riñón (Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2003) mediante la activación de la PKC. La administración de PMA causa un efecto similar al producido por la melatonina en los microtúbulos y los microfilamentos en estas líneas celulares, mientras que el inhibidor específico de la PKC, la bisindolilmaleimida, bloquea los efectos de este indol y de la PMA en la organización del citoesqueleto.

Estos resultados –y el hecho de que la melatonina incrementa la actividad de la PKC *in vitro* (Antón-Tay *et al.*, 1998) y se une a la calmodulina en presencia de calcio con alta afinidad (Benítez-King *et al.*, 1993)– sugieren que el efecto de la melatonina en la organización de los microfilamentos y los microtúbulos observado en el presente estudio puede estar mediado por la activación de la PKC y el antagonismo de la calmodulina. No obstante, es necesario evaluar estas aseveraciones en futuras investigaciones y asimismo estudiar el mecanismo mediante el cual la melatonina ejerce su efecto en la memoria espacial.

Los sujetos que padecen la enfermedad de Alzheimer presentan la patología beta amiloide/tau, deterioro en la cognición y en la memoria, alteración de los ritmos

circadianos –los de temperatura corporal y ciclo sueño-vigilia– y disminución en los niveles de melatonina durante la noche. Por otra parte, se ha descrito que, en modelos experimentales de neurodegeneración y en modelos animales que presentan la patología de la enfermedad de Alzheimer, esta hormona disminuye la hiperfosforilación de la proteína tau, regula el equilibrio de fosforilación-defosforilación de esta proteína, disminuye la agregación/deposición de la proteína beta amiloide en el cerebro (Jiménez-Rubio *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2004; Benítez-King *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2005; Liu y Wang, 2002; Olcese *et al.*, 2009) y restablece la formación de neuritas (Jiménez-Rubio *et al.*, 2007).

En pacientes con enfermedad de Alzheimer esta hormona mejora la calidad del sueño (Fainstein *et al.*, 1997; Jean-Louis *et al.*, 1998; Cohen-Mansfield *et al.*, 2000; Brusco *et al.*, 1998, 2000; Asayama *et al.*, 2003; Mahlberg *et al.*, 2004; Singer *et al.*, 2003) y retrasa la progresión de los signos cognitivos y conductuales de la enfermedad (Brusco *et al.*, 2000). Por lo tanto, se sugiere que los niveles disminuidos de la melatonina causados por la pinealectomía o relacionados con la etiología de la enfermedad de Alzheimer (Liu *et al.*, 1999) participan en las alteraciones del citoesqueleto que conducen a deficiencias funcionales, como el deterioro de la memoria.

En conclusión, la evidencia obtenida en el presente estudio sugiere el empleo de la melatonina para restablecer las alteraciones morfofuncionales y del citoesqueleto -así como el déficit cognitivo- que se observan en la enfermedad de Alzheimer y otras demencias.

IX. CONCLUSIONES

- La organización de los microfilamentos presenta una variación diaria, mientras que no hay una variación temporal evidente en la organización de los microtúbulos.
- En ausencia de melatonina por un tiempo prolongado, los microfilamentos y los microtúbulos se desestabilizan y se incrementa la fracción despolimerizada de ambas proteínas.
- El tratamiento con melatonina restableció la proporción de actina organizada en microfilamentos, mientras que la administración de melatonina no restableció la proporción de tubulina organizada en microtúbulos.
- Las ratas control y pinealectomizadas tratadas con vehículo y melatonina presentan inmunorreactividad a la tubulina en el área CA1 del hipocampo. Sin embargo, en los animales tratados con melatonina se observaron microtúbulos más largos y distribuidos en los procesos celulares.
- La administración de melatonina disminuye los déficit en la memoria inducidos por la pinealectomía.

- El tiempo para completar la prueba se incrementó en los animales pinealectomizados, mientras que en los tratados con melatonina se observó una disminución en el tiempo para encontrar los 8 *pellets*.

X.BIBLIOGRAFÍA

-Allison DW, Gelfand VI, Spector I, Craig AM. Role of actin in anchoring postsynaptic receptors in cultured hippocampal neurons: differential attachment of NMDA versus AMPA receptors. J Neurosci 1998; 18: 2423-2436.

-Alzheimer A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. Allg Z Psychiat Psych Gerichtl Med 1907; 64: 146-148.

-Andreadis A, Broderick JA, Kosik KS. Relative exon affinities and suboptimal splice site signals lead to non-equivalence of two cassette exons. Nucleic Acids Res 1995; 23: 3585-3593.

-Antón-Tay F, Forray C, Ortega-Corona BG. Subneuronal fate of intracerebroventricular injected ³H-melatonin. J Pineal Res 1988; 5: 125-133.

-Antón-Tay F, Ramírez G, Martínez I, Benítez-King G. In vitro stimulation of protein kinase C by melatonin. Neurochem Res 1998; 23: 605-610.

-Arendt J. Melatonin and the Mammalian Pineal Gland. London: Chapman and Hall; 1995.

-Arias C, Sharma N, Davies P, Shafit-Zagardo B. Okadaic acid induces early changes in microtubule-associated protein 2 and tau phosphorylation prior to neurodegeneration in cultured cortical neurons. *J Neurochem* 1993; 61: 673-682.

-Aronoff JM, Gonnerman LM, Almor A, Arunachalam S, Kempler D, Andersen ES. Information content versus relational knowledge: Semantic deficits in patients with Alzheimer's disease. *Neuropsychologia* 2006; 44: 21-35.

-Asayama K, Yamadera H, Ito T, Suzuki H, Kudo Y, Endo S. Double blind study of melatonin effects on the sleep-wake rhythm, cognitive and non-cognitive functions in Alzheimer type dementia. *J Nippon Med Sch* 2003; 70: 334-341.

-Augustinack JC, Schneider A, Mandelkow EM, Hyman BT. Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 2002; 103: 26-35.

-Axelrod J, Shein HM, Wurtman RJ. Stimulation of C¹⁴-melatonin synthesis from C¹⁴-tryptophan by noradrenaline in rat pineal in organ culture. *Proc Natl Acad Sci USA*

1969; 62: 544-549.

-Axelrod J, Weissbach H. Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to melatonin. Science 1960; 131: 1312.

-Baddeley AD, Bressi S, Della Sala S, Logie R, Spinnler H. The decline of working memory in Alzheimer's disease. A longitudinal study. Brain 1991; 114: 2521-2542.

-Bamburg JR, Bloom GS. Cytoskeletal Pathologies of Alzheimer Disease. Cell Motil Cytoskeleton 2009; 66: 635-649.

-Baudier J, Cole RD. Interactions between the microtubule-associated tau proteins and S100b regulate tau phosphorylation by the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. J Biol Chem 1988; 263: 5876-5883.

-Baumann K, Mandelkow EM, Biernat J, Piwnica-Worms H, Mandelkow E. Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5. FEBS Lett 1993; 336: 417-424.

-Bayles KA, Tomoeda CK. Confrontation naming impairment in dementia. Brain Lang 1983; 19: 98-114.

-Becker JT, Walker JA, Olton DS, O'Connell BC. Neuroanatomical bases of short-term spatial memory in the rat. Society for Neuroscience Abstracts 1978; 4: 73.

-Bellon A, Ortiz-López L, Ramírez-Rodríguez G, Antón-Tay F, Benítez-King G. Melatonin induces neuritogenesis at early stages in N1E-115 cells through actin rearrangements via activation of protein kinase C and Rho-associated kinase. J Pineal Res 2007; 42: 214-221.

-Benítez-King G. Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. J Pineal Res 2006; 40: 1-9.

-Benítez-King G. PKC activation by melatonin modulates vimentin intermediate filament organization in N1E-115 cells. J Pineal Res 2000; 29: 8-14.

-Benítez-King G, Antón-Tay F. Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. Experientia 1993; 49:635-641.

-Benítez-King G, Hernández ME, Tovar R, Ramírez G. Melatonin activates PKC-alpha but not PKC-epsilon in N1E-115 cells. Neurochem Int 2001; 39: 95-102.

-Benítez-King G, Huerto-Delgadillo L, Antón-Tay F. Binding of ^3H -melatonin to calmodulin. Life Sci 1993; 53: 201-207.

-Benítez-King G, Huerto-Delgadillo L, Antón-Tay F. Melatonin effects on the cytoskeletal organization of MDCK and neuroblastoma N1E-115 cells. J Pineal Res 1990; 9: 209-220.

-Benítez-King G, Huerto-Delgadillo L, Antón-Tay F. Melatonin modifies calmodulin cell levels in MDCK and N1E-115 cell lines and inhibits phosphodiesterase activity in vitro. Brain Res 1991; 557: 289-292.

-Benítez-King G, Ortíz-López L, Jiménez-Rubio G. Melatonin precludes cytoskeletal collapse caused by hydrogen peroxide: participation of protein kinase C. Therapy 2005; 2: 762-778.

-Benítez-King G, Ortíz-López L, Jiménez-Rubio G, Ramírez-Rodríguez G. Haloperidol causes cytoskeletal collapse in N1E-115 cells through tau hyperphosphorylation induced by oxidative stress: Implications for neurodevelopment. Eur J Pharmacol 2010; 644: 24-31.

-Benítez-King G, Ortíz-López, L, Morales-Mulia S, Jiménez-Rubio G, Ramírez-Rodríguez G, Meza I. Phosphorylation-Dephosphorylation imbalance of cytoskeletal associated proteins in neurodegenerative diseases. Recent Patents CNS Drug Discovery 2006; 1: 219-230.

-Benítez-King G, Ríos A, Martínez A, Antón-Tay F. In vitro inhibition of Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II activity by melatonin. Biochim Biophys Acta 1996; 1290:191-196.

-Benítez-King G, Túnez I, Bellón A, Ortíz GG, Antón-Tay F. Melatonin prevents cytoskeletal alterations and oxidative stress induced by okadaic acid in N1E-115 cells. Exp Neurol 2003; 182: 151-159.

-Bernstein BW, Maloney MT, Bamburg JR. Actin and diseases of the nervous system. En Gallo G, Lanier LL (Eds). Neurobiology of Actin. New York: Springer; 2011.

-Bialojan C, Takai A. Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. Biochem J 1988; 256: 283-290.

-Bianchi M, Fone KF, Azmi N, Heidbreder CA, Hagan JJ, Marsden CA. Isolation rearing induces recognition memory deficits accompanied by cytoskeletal alterations in rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 2006; 24: 2894-2902.

-Biernat J, Gustke N, Drewes G, Mandelkow EM, Mandelkow E. Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron* 1993; 11: 153-163.

-Bliwise DL, Tinklenberg J, Yesavage JA, Davies H, Pursley AM, Petta DE, Widrow L, Guilleminault C, Zarcone VP, Dement WC. REM latency in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 1989; 25: 320-328.

-Bordt SL, McKeon RM, Li PK, Witt-Enderby PA, Melan MA. N1E-115 mouse neuroblastoma cells express MT1 melatonin receptors and produce neurites in response to melatonin. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1499: 257-264.

-Borg J, London J. Copper/zinc superoxide dismutase overexpression promotes survival of cortical neurons exposed to neurotoxins in vitro. *J Neurosci Res* 2002; 70: 180-189.

-Bors O., Ralston WC. A simple assay of mammalian pineal extracts. *Proc Soc Exp Biol Med* 1951; 77: 807-808.

-Braak E, Arai K, Braak H. Cerebellar involvement in Pick's disease: Affliction of mossy fibers, monodendritic brush cells, and dentate projection neurons. *Exp Neurol* 1999; 159: 153-163.

-Braak H, Braak E. Development of Alzheimer-related neurofibrillary changes in the neocortex inversely recapitulates cortical myelogenesis. *Acta Neuropathol (Berl)* 1996a; 92: 197-201.

-Braak H, Braak E. Evolution of the neuropathology of Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand Suppl* 1996b; 165: 3-12.

-Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol (Berl)* 1991; 82: 239-259.

-Bramblett GT, Goedert M, Jakes R, Merrick SE, Trojanowski JQ, Lee VM. Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. *Neuron* 1993; 10: 1089-1099.

-Brewton LS, Haddad L, Azmitia EC. Colchicine-induced cytoskeletal collapse and apoptosis in N-18 neuroblastoma cultures is rapidly reversed by applied S-100 beta. Brain Res 2001; 912: 9-16.

-Brusco LI, Márquez M, Cardinali DP. Melatonin treatment stabilizes chronobiologic and cognitive symptoms in Alzheimer's disease. Neuroendocrinol Lett 2000; 21: 39-42.

-Brusco LI, Márquez M, Cardinali DP. Monozygotic twins with Alzheimer's disease treated with melatonin: Case report. J Pineal Res 1998; 25: 260-263.

-Bubenik GA. Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. Dig Dis Sci 2002; 47: 2336-2348.

-Buee-Scherrer V, Condamines O, Mourton-Gilles C, Jakes R, Goedert M, Pau B, Delacourte A. AD2, a phosphorylation-dependent monoclonal antibody directed against tau proteins found in Alzheimer's disease. Brain Res Mol Brain Res 1996; 39: 79-88.

-Buijs RM, Kalsbeek A. Hypothalamic integration of

central and peripheral clocks. Nat Rev Neurosci 2001; 2: 521-526.

-Butters N, Granholm E, Salmon DP, Grant I, Wolfe J. Episodic and semantic memory: A comparison of amnesic and demented patients. J Clin Exp Neuropsychol 1987; 9: 479-497.

-Cahill GM, Besharse JC. Circadian rhythmicity in vertebrate retinas: Regulation by a photoreceptor oscillator. Progress in retinal and eye research 1995; 14: 267-291.

-Cambray-Deakin MA, Burgoyne RD. Posttranslational modifications of α -tubulin: acetylated and detyrosinated forms in axons of rat cerebellum. J Cell Biol 1987; 104: 1569-1574.

-Cardinali DP, Brusco LI, Liberczuk C, Furio AM. The Use of Melatonin in Alzheimer's Disease. Neuro Endocrinol Lett 2002; 23(Suppl 1): 20-23.

-Carlesimo GA, Oscar-Berman M. Memory deficits in Alzheimer's patients: a comprehensive review. Neuropsychol Rev 1992; 3: 119-169.

-Chen P, Ratcliff G, Belle SH, Cauley JA, DeKosky ST, Ganguli M. Patterns of cognitive decline in presymptomatic Alzheimer disease: A prospective community study. *Arch Gen Psychiatry* 2001; 58: 853-858.

-Chiou JY, Westhead EW. Okadaic acid, a protein phosphate inhibitor, inhibits nerve growth factor-directed neurite outgrowth in PC12 cells. *J Neurochem* 1992; 59: 1963-1966.

-Cid-Arregui A, De Hoop M, Dotti CG. Mechanisms of neuronal polarity. *Neurobiol Aging* 1995; 16: 239-243.

-Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW. Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J Mol Biol* 1977a; 116: 227-247.

-Cleveland DW, Hwo SY, Kirschner MW. Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol Biol* 1977b; 116: 207-225.

-Cohen-Mansfield J, Garfinkel D, Lipson S. Melatonin for treatment of sundowning in elderly persons with dementia - a preliminary study. *Arch Gerontol Geriatr* 2000; 31: 65-76.

-Collette F, Van der Linden M, Bechet S, Salmon E. Phonological loop and central executive functioning in Alzheimer's disease. *Neuropsychologia* 1999; 37: 905-918.

-Conti A, Conconi S, Hertens E, Skwarlo-Sonta K, Markowska M, Maestroni JM. Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *J Pineal Res* 2000; 28: 193-202.

-Costa EJ, Lopes RH, Lamy-Freund MT. Permeability of pure lipid bilayers to melatonin. *J Pineal Res* 1995; 19: 123-126.

-Cronin-Golomb A, Amick M. Spatial abilities in aging, Alzheimer's disease, and Parkinson's disease. En: Boller F, Cappa S (eds). *Handbook of neuropsychology*, vol. 6: Aging and dementia, 2nd ed. Amsterdam: Elsevier; 2001.

-Davies CA, Mann DM, Sumpter PQ, Yates PO. A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 1987; 78: 151-164.

-De Butte M, Pappas BA. Pinealectomy causes hippocampal CA1 and CA3 cell loss: reversal by melatonin

supplementation. Neurobiol Aging 2007; 28: 306-313.

-DeKosky ST, Scheff SW. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. Ann Neurol 1990; 27: 457-464.

-De Toledo-Morrell L, Goncharova I, Dickerson B, Wilson RS, Bennett DA. From healthy aging to early Alzheimer's disease: In vivo detection of entorhinal cortex atrophy. Ann NY Acad Sci 2000; 911: 240-253.

-Djeridane Y, Touitou Y. Melatonin synthesis in the rat harderian gland: age- and time-related effects. Exp Eye Res 2001; 72: 487-492.

-Douglas RJ. The hippocampus and behavior. Psychol Bull 1967; 67: 416-422.

-Drechsel DN, Hyman AA, Cobb MH, Kirschner MW. Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. Mol Biol Cell 1992; 3: 1141-1154.

-Drewes G, Ebner A, Preuss U, Mandelkow EM, Mandelkow E. MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger

microtubule disruption. Cell 1997; 89: 297-308.

-Drewes G, Lichtenberg-Kraag B, Doring F, Mandelkow EM, Biernat J, Goris J, Doree M, Mandelkow E. Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state. EMBO J 1992; 11: 2131-2138.

-Drubin D, Kobayashi S, Kirschner M. Association of tau protein with microtubules in living cells, Ann N Y Acad Sci 1986; 466: 257-268.

-Dupont-Wallois L, Sautiere PE, Cocquerelle C, Bailleul B, Delacourte A, Cailliet- Boudin ML. Shift from fetal-type to Alzheimer-type phosphorylated tau proteins in SKNSH-SY 5Y cells treated with okadaic acid. FEBS Lett 1995; 357: 197-201.

-Eichenbaum H, Cohen NJ, Otto T, Wible C. Memory representation in the hippocampus: Functional domain and functional organization. En: Squire LR, Lynch G, Weinberger NM, McGaugh JL (eds). Memory organization and locus of change. London: Oxford University Press; 1992.

-El-Sherif Y, Tesoriero J, Hogan MV, Wieraszko A. Melatonin regulates neuronal plasticity in the hippocampus. J Neurosci Res 2003; 72: 454-460.

-Fainstein I, Bonetto A, Brusco LI, Cardinali D.P. Effects of Melatonin in Elderly Patients With Sleep Disturbance. A Pilot Study. *Curr Ther Res* 1997; 58: 990-1000.

-Fournier I, Ploye F, Cottet-Emard JM, Brun J, Claustrat B. Folate deficiency alters melatonin secretion in rats. *J Nutr* 2002; 132: 2781-2784.

-Freire F, Cardinali DP. Effects of melatonin treatment and environmental lighting on the ultrastructural appearance, melatonin synthesis, norepinephrine turnover and microtubule protein content of the rat pineal gland. *J Neural Transm* 1975; 37: 237-257.

-Fukuda M, Hasezawa S, Nakajima N, Kondo N. Changes in tubulin protein expression in guard cells of *Vicia faba* L. accompanied with dynamic organization of microtubules during the diurnal cycle. *Plant Cell Physiol* 2000; 41: 600-607.

-Geula C, Mesulam MM. Cortical cholinergic fibers in aging and Alzheimer's disease: a morphometric study. *Neuroscience* 1989; 33: 469-481.

-Gillespie CS, Wilson R, Davidson A, Brophy PJ. Characterization of a cytoskeletal matrix associated with myelin from rat brain. *Biochem J* 1989; 260: 689-696.

-Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 122: 1131-1135.

-Goedert M, Hasegawa M, Jakes R, Lawler S, Cuenda A, Cohen P. Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases, *FEBS Lett* 1997; 409: 57-62.

-Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 1989a; 3: 519-526.

-Goedert M, Spillantini MG, Potier MC, Ulrich J, Crowther RA. Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO J* 1989b; 8: 393-399.

-González-Billault C, Engelke M, Jiménez-Mateos EM, Wandosell F, Cáceres A, Avila J. Participation of structural microtubule-associated proteins (MAPs) in the development of neuronal polarity. *J Neurosci Res* 2002; 67: 713-719.

-Greenwood JA, Scott CW, Spreen RC, Caputo CB, Johnson GV. Casein kinase II preferentially phosphorylates human tau isoforms containing an amino-terminal insert. Identification of threonine 39 as the primary phosphate acceptor. *J Biol Chem* 1994; 269: 4373-4380.

-Halpain S, Hipolito A, Saffer L. Regulation of F-actin stability in dendritic spines by glutamate receptors and calcineurin. *J Neurosci* 1998; 18: 9835-9844.

-Handelmann GE, Coyle JT, Olton DS. Lesions of CA3 pyramidal cells with kainic acid impairs spatial memory in rats. *Society for neuroscience abstracts* 1978; 4: 221.

-Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 1992; 256: 184-185.

-Harper DG, Stopa EG, McKee AC, Satlin A, Fish D, Volicer L. Dementia severity and Lewy bodies affect circadian rhythms in Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* 2004; 25:

771-781.

-Harper DG, Stopa EG, McKee AC, Satlin A, Harlan PC, Goldstein R, Volicer L. Differential circadian rhythm disturbances in men with Alzheimer disease and frontotemporal degeneration. Arch Gen Psychiatry 2001; 58: 353-360.

-Heredia L, Helguera P, de Olmos S, Kedikian G, Sola VF, LaFerla F, Staufenbiel M, de Olmos J, Busciglio J, Caceres A, Lorenzo A. Phosphorylation of actin-depolymerizing factor/cofilin by LIM-kinase mediates amyloid beta-induced degeneration: a potential mechanism of neuronal dystrophy in Alzheimer's disease. J Neurosci 2006; 26: 6533-6542.

-Himmler A, Drechsel D, Kirschner MW, Martin Jr DW. Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule binding domains and variable N-terminal domains. Mol Cell Biol 1989; 9: 1381-1388.

-Hirano A. Hirano bodies and related neuronal inclusions. Neuropathol Appl Neurobiol 1994; 20: 3-11.

-Hirano A, Dembitzer HM, Kurland LT, Zimmerman HM. The fine structure of some intraganglionic alterations.

Neurofibrillary tangles, granulovacuolar bodies and "rod-like" structures as seen in Guam amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex. J Neuropathol Exp Neurol 1968; 27: 167-182.

-Hirsh R. The hippocampus and contextual retrieval of information from memory: A theory. Behavioral Biology 1974; 12: 421-444.

-Hirsh R. The hippocampus, conditional operations and cognition. Physiological Psychology 1980; 8: 175-182.

-Honig WK. Studies of working memory in the pigeon. En: Hulse SH, Fowler H, Honig WK (eds). Cognitive processes in animal behavior. Hillsdale NJ: Lawrence Erlbaum Associates; 1978.

-Huerto-Delgadillo L, Antón-Tay F, Benítez-King G. Effects of melatonin on microtubule assembly depend on hormone concentration: role of melatonin as a calmodulin antagonist. J Pineal Res 1994; 17: 55-62.

-Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Zaidi T, Merz PA, Wen GY, Shaikh SS, Wisniewski HM, Alafuzoff I, Winblad B. Defective brain microtubule assembly in Alzheimer's disease. Lancet 1986; 2: 421-426.

-Iuvone PM, Tosini G, Pozdeyev N, Haque R, Klein DC, Chaurasia SS. Circadian clocks, clock networks, arylalkylamine N-acetyltransferase, and melatonin in the retina. Prog Retin Eye Res 2005; 24: 433-456.

-Jack CR Jr, Petersen RC, Xu Y, O'Brien PC, Smith GE, Ivnik RJ, Boeve BF, Tangalos EG, Kokmen E. Rates of hippocampal atrophy correlate with change in clinical status in aging and AD. Neurology 2000; 55: 484-489.

-Jack CR Jr, Petersen RC, Xu YC, Waring SC, O'Brien PC, Tangalos EG, Smith GE, Ivnik RJ, Kokmen E. Medial temporal atrophy on MRI in normal aging and very mild Alzheimer's disease. Neurology 1997; 49: 786-794.

-Jarrard LE. On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. Behav Neural Biol 1993; 60: 9-26.

-Jarrard LE. Selective hippocampal lesions: differential effects on performance by rats of spatial task with preoperative versus postoperative training. J Comp Physiol Psychol 1978; 92: 1119-1127.

-Jean-Louis G, von Gizycki H, Zizi F. Melatonin effects on sleep, mood, and cognition in elderly with mild

cognitive impairment. J Pineal Res 1998; 25: 177-183.

-Jean-Louis G, von Gizycki H, Zizi F. Predictors of subjective sleepiness induced by melatonin administration. J Psychosom Res 1999; 47: 355-358.

-Jicha GA, Weaver C, Lane E, Vianna C, Kress Y, Rockwood J, Davies P. cAMP-dependent protein kinase phosphorylations on tau in Alzheimer's disease. J Neurosci 1999; 19: 7486-7494.

-Jiménez-Rubio G, Benítez-King G, Ortiz-López L. Melatonin elicits neuritogenesis and reverses tau hyperphosphorylation in N1E-115 neuroblastoma cells treated with okadaic acid. En: Fernandes AJ (ed). Focus on Neuroblastoma Research. Hauppauge, NY: Nova Science Publishers; 2007.

-Johnson JK, Head E, Kim R, Starr A, Cotman CW. Clinical and pathological evidence for a frontal variant of Alzheimer disease. Arch Neurol 1999; 56: 1233-1239.

-Karakaş A, Coşkun H; Kaya A. The effects of pinealectomy, melatonin injections and implants on the spatial memory performance of male Wistar rats. Biol Rhythm Res 2011; 42: 1-16.

-Kim D, Su J, Cotman CW. Sequence of neurodegeneration and accumulation of phosphorylated tau in cultured neurons after okadaic treatment. Brain Res 1999; 839: 253-262.

-Kimble DP. Hippocampus and internal inhibition. Psychol Bull 1968; 70: 285-295.

-Klein DC. Arylalkylamine N-acetyltransferase: "the Timezyme". J Biol Chem 2007; 282: 4233-4237.

-Knopman D. Neurodegeneration: the Molecular Pathology of Dementia and Movement Disorders. En Dickson D (Ed). Basel: ISN Neuropath Press; 2003.

-Kovács GL, Gajári I, Telegdy G, Lissák K. Effect of melatonin and pinealectomy on avoidance and exploratory activity in the rat. Physiol Behav 1974; 13: 349-355.

-Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227: 680-685.

-Lee G, Neve RL, Kosik KS. The microtubule binding domain of tau protein. Neuron 1989; 2: 1615-1624.

-Lenk R, Ransom L, Kaufmann Y, Penman S. A cytoskeletal structure with associated polyribosomes obtained from HeLa cells. *Cell* 1977; 10: 67-78.

-Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes *J Am Chem Soc* 1958; 80: 2587.

-Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, Yu CE, Jondro PD, Schmitt SD, Wang K, Crowley AC, Fu YH, Guenette SY, Galas D, Nemens E, Wijsman EM, Bird TD, Schellenberg GD, Tanzi RE. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 1995; 269: 973-977.

-Lewy AJ, Tetsuo M, Markey SP, Goodwin FK, Kopin IJ. Pinealectomy abolishes plasma melatonin in the rat. *J Clin Endocrinol Metab* 1980; 50: 204-205.

-Li XC, Wang ZF, Zhang JX, Wang Q, Wang JZ. Effect of melatonin on calyculin A-induced tau hyperphosphorylation. *Eur J Pharmacol* 2005; 510, 25-30.

-Lindwall G, Cole RD. Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *J Biol*

Chem 1984; 259: 5301-5305.

-Ling Z-Q, Tiana Q, Wanga L, Fua Z-Q, Wanga X-C, Wanga Q, Wanga J-Z. Constant illumination induces Alzheimer-like damages with endoplasmic reticulum involvement and the protection of melatonin. J Alzheimers Dis 2009; 16: 287-300.

-Litersky JM, Johnson GV. Phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase inhibits the degradation of tau by calpain. J Biol Chem 1992; 267: 1563-1568.

-Liu R-Y, Zhou J-N, Heerikhuize JV, Hofman MA, Swaab DF. Decreased melatonin levels in postmortem cerebrospinal fluid in relation to aging, Alzheimer's disease, and Apolipoprotein E-ε4/4 genotype. J Clin Endocrinol Metab 1999; 84: 323-327.

-Liu SJ, Wang JZ. Alzheimer-like tau phosphorylation induced by wortmannin in vivo and its attenuation by melatonin. Acta Pharmacol Sin 2002; 23: 183-187.

-Liu WK, Williams RT, Hall FL, Dickson DW, Yen SH. Detection of a Cdc2-related kinase associated with Alzheimer paired helical filaments. Am J Pathol 1995; 146: 228-238.

-Lockley SW, Skene DJ, James K, Thapan K, Wright J, Arendt J. Melatonin administration can entrain the free-running circadian system of blind subjects. *J Endocrinol* 2000; 164: R1-6.

-Lodish H, Baltimore D, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Darnell J. *Molecular Cell Biology*. 3rd Ed. New York: Scientific American Books; 1995.

-Loewenstein RJ, Weingartner H, Gillin JC, Kaye W, Ebert M, Mendelson WB. Disturbances of sleep and cognitive functioning in patients with dementia. *Neurobiol Aging*. 1982; 3: 371-377.

-Lonergan TA. Regulation of Cell Shape in *Euglena gracilis*: I. Involvement of the Biological Clock, Respiration, Photosynthesis, and Cytoskeleton. *Plant Physiol* 1983; 71: 719-730.

-Lovenberg W, Jequier E, Sjoerdsma A. Tryptophan hydroxylation: measurement in pineal gland, brainstem, and carcinoid tumor. *Science* 1967; 155: 217-219.

-Lovenberg W, Weissbach H, Udenfriend S. Aromatic L-amino acid decarboxylase. *J Biol Chem* 1962; 237:89-93.

-Lowry OH, Rosenbrough HJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193: 265-275.

-Luboshitzky R, Ophir U, Nave R, Epstein R, Shen-Orr Z, Herer P. The effect of pyridoxine administration on melatonin secretion in normal men. Neuro Endocrinol Lett 2002; 23: 213-217.

-Magri F, Sarra S, Cinchetti W, Guazzoni V, Fioravanti M, Cravello L, Ferrari E. Qualitative and quantitative changes of melatonin levels in physiological and pathological aging and in centenarians. J Pineal Res 2004; 36: 256-261.

-Mahlberg R, Kunz D, Sutej I, Kuhl KP, Hellweg R. Melatonin treatment of day-night rhythm disturbances and sundowning in Alzheimer Disease: an open-label pilot study using actigraphy. J Clin Psychopharmacol 2004; 24: 456-459.

-Maloney MT, Bamburg JR. Cofilin-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and other amyloidopathies. Mol Neurobiol 2007; 35: 21-44.

-Martin A, Fedio P. Word production and comprehension in Alzheimer's disease: The breakdown of semantic knowledge. *Brain Lang* 1983; 19: 124-141.

-Matsuo ES, Shin RW, Billingsley ML, Van deVoorde A, O'Connor M, Trojanowski JQ, Lee VM. Biopsy-derived adult human brain tau is phosphorylated at many of the same sites as Alzheimer's disease paired helical filament tau. *Neuron* 1994; 13: 989-1002.

-McCord CP, Allen FP. Evidences associating pineal gland function with alterations in pigmentation *J Exp Zool* 1917; 23: 207-224.

-McDonald RJ, White NM. A triple dissociation of memory systems: hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. *Behav Neurosci* 1993; 107: 3-22.

-Milzani A, Dalledonne I, Colombo R. Prolonged oxidative stress on actin. *Arch Biochem Biophys* 1997; 339: 267-274.

-Mishima K, Tozawa T, Satoh K, Matsumoto Y, Hishikawa Y, Okawa M. Melatonin secretion rhythm disorders in patients with senile dementia of Alzheimer's type with disturbed sleep-waking. *Biol Psychiatry* 1999; 45: 417-421.

-Monsch AU, Bondi MW, Butters N, Salmon DP, Katzman R, Thal LJ. Comparisons of verbal fluency tasks in the detection of dementia of the Alzheimer type. Arch Neurol 1992; 49: 1253-1258.

-Montplaisir J, Petit D, Lorrain D, Gauthier S, Nielsen T. Sleep in Alzheimer's disease: further considerations on the role of brainstem and forebrain cholinergic populations in sleep-wake mechanisms. Sleep 1995; 18:145-148.

-Moore RY. Neural control of the pineal gland. Behav Brain Res 1996; 73: 125-130.

-Morrison JH, Hof PR, Bouras C. An anatomic substrate for visual disconnection in Alzheimer's disease. Ann NY Acad Sci 1991; 640: 36-43.

-Neve RL, Harris P, Kosik KS, Kurnit DM, Donlon TA. Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. Brain Res 1986; 387: 271-280.

-Nozumi M, Nakagawa H, Miki H et al. Differential localization of WAVE isoforms in filopodia and

lamellipodia of the neuronal growth cone. *J Cell Sci* 2003; 116: 239-246.

-Ohashi Y, Okamoto N, Uchida K, Iyo M, Mori N, Morita Y. Daily rhythm of serum melatonin levels and effect of light exposure in patients with dementia of the Alzheimer's type. *Biol Psychiatry*. 1999; 45:1646-1652.

-O'Keefe J, Dostrovsky J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res* 1971; 34: 171-175.

-O'Keefe J, Nadel L. The hippocampus as a cognitive map. *Behav Brain Sci* 1979; 2: 487-533.

-O'Keefe JA, Nadel L. The hippocampus as a cognitive map. London: Oxford University Press; 1978.

-Olcese JM, Cao C, Mori T, Mamcarz MB, Maxwell A, Runfeldt MJ, Wang L, Zhang C, Lin X, Zhang G, Arendash GW. Protection against cognitive deficits and markers of neurodegeneration by long-term oral administration of melatonin in a transgenic model of Alzheimer disease. *J Pineal Res* 2009; 47: 82-96.

-Olton DS. Spatial memory. *Sci Am* 1977; 236: 82-98.

-Olton DS, Becker JT, Handelman GE. Hippocampus, space and memory. Behav brain Sci 1979; 2: 313-322.

-Olton DS, Feustle WA. Hippocampal function required for nonspatial working memory. Exp Brain Res 1981; 41: 380-389.

-Olton DS, Samuelson RJ. Remembrance of places passed: Spatial memory in rats. J Exp Psychol Anim Behav Processes 1976; 2: 97-116.

-Olton DS, Walker JA, Gage FH. Hippocampal connections and spatial discrimination. Brain Res 1978; 139: 295-308.

-Olton DS, Werz MA. Hippocampal function and behavior: spatial discrimination and response inhibition. Physiol Behav 1978; 20: 597-605.

-Parasuraman R, Haxby JV. Attention and brain function in Alzheimer's disease: A review. Neuropsychology 1993; 7: 242-272.

-Pardridge WM, Meitus LJ. Transport of albumin-bound melatonin through the blood-brain barrier. J Neurochem 1980; 34: 1761-1763.

-Perry G, Nunomura A, Hirai K, Zhu X, Pérez M, Avila J, Castellani RJ, Atwood CS, Aliev G, Sayre LM, Takeda A, Smith MA. Is oxidative damage the fundamental pathogenic mechanism of Alzheimer's and other neurodegenerative diseases? *Free Radical Biology & Medicine* 2002; 33: 1475-1479.

-Perry RJ, Hodges JR. Attention and executive deficits in Alzheimer's disease. A critical review. *Brain* 1999; 122: 383-404.

-Pierre M, Nunez J. Multisite phosphorylation of tau proteins from rat brain, *Biochem Biophys Res Commun* 1983; 115: 212-219.

-Pipeleers DG, Pipeleers-Marichal MA, Sherline P, Kipnis DM. A sensitive method for measuring polymerized and depolymerized forms of tubulin in tissues. *J Cell Biol* 1977; 74: 341-350.

-Planel E, Sun X, Takashima A. Role of GSK-3 beta in Alzheimer's disease pathology. *Drug Dev Res* 2002; 56: 491-510.

-Pohlmeyer G, Reuss S, Baum A. An improved technique for visually controlled pinealectomy in the rat. *J Exp Anim Sci* 1994; 36: 84-88.

-Prinz PN, Peskind ER, Vitaliano PP, Raskind MA, Eisdorfer C, Zemcuznikov N, Gerber CJ. Changes in the sleep and waking EEGs of nondemented and demented elderly subjects. *J Am Geriatr Soc*. 1982; 30: 86-93.

-Ramírez-Rodríguez G, Meza I, Hernández ME, Castillo A, Benítez-King G. Melatonin induced cyclic modulation of vectorial water transport in kidney derived MDCK cells. *Kidney Int* 2003; 63: 1356-1364.

-Redman J, Armstrong S. Free-running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin. *Science* 1983; 219: 1089-1091.

-Reiter RJ. Functional diversity of the pineal hormone melatonin: its role as an antioxidant. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1996; 104: 10-16.

-Reiter RJ. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia* 1993; 49: 654-664.

-Reynolds CF 3rd, Kupfer DJ, Taska LS, Hoch CC, Spiker DG, Sewitch DE, Zimmer B, Marin RS, Nelson JP, Martin D, Morycz R. EEG sleep in elderly depressed, demented, and healthy subjects. *Biol Psychiatry* 1985; 20: 431-442.

-Reynolds CH, Utton MA, Gibb GM, Yates A, Anderton BH. Stress-activated protein kinase/c-jun N-terminal kinase phosphorylates tau protein. *J Neurochem* 1997; 68: 1736-1744.

-Roberts K. Cytoplasmic microtubules and their functions. *Prog Biophys Mol Biol* 1974; 28: 371-420.

-Sack RL, Brandes RW, Kendall AR, Lewy AJ. Entrainment of free-running circadian rhythms by melatonin in blind people. *N Engl J Med* 2000; 343: 1070-1077.

-Salmon DP. Disorders of memory in Alzheimer's disease. En: Cermak LS (ed). *Handbook of neuropsychology*, vol. 2: Memory and its disorders. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier; 2000.

-Sánchez S, Paredes SD, Martín MI, Barriga C, Rodríguez AB. Effect of tryptophan administration on circulating levels of melatonin and phagocytic activity. *J Appl Biomed* 2004; 2: 169-177.

-Satlin A, Volicer L, Stopa EG, Harper D. Circadian locomotor activity and core-body temperature rhythms in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1995; 16: 765-771.

-Scheuner D, Eckman C, Jensen M, Song X, Citron M, Suzuki N, Bird TD, Hardy J, Hutton M, Kukull W, Larson E, Levy-Lahad E, Viitanen M, Peskind E, Poorkaj P, Schellenberg G, Tanzi R, Wasco W, Lannfelt L, Selkoe D, Younkin S. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med* 1996; 2: 864-870.

-Schoenfeld TA, Obar RA. Diverse distribution and function of fibrous microtubule-associated proteins in the nervous system. *Int Rev Cytol* 1994; 151: 67-137.

-Sergeant N, Bussiere T, Vermersch P, Lejeune JP, Delacourte A. Isoelectric point differentiates PHF-tau from biopsy-derived human brain tau proteins. *NeuroReport* 1995; 6: 2217-2220.

-Setou M, Hayasaka T, Yao I. Axonal transport versus dendritic transport. *J Neurobiol* 2004; 58: 201-206.

-Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Chi H, Lin C, Li G, Holman K, Tsuda T, Mar L, Foncin JF, Bruni AC, Montesi MP, Sorbi S, Rainero I, Pinessi L, Nee L, Chumakov I, Pollen D, Brookes A, Sanseau P, Polinsky RJ, Wasco W, da Silva HAR, Haines JL, Pericak-Vance MA, Tanzi RE, Roses AD, Fraser PE, Rommens JM, St George-Hyslop PH. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 1995; 375: 754-760.

-Singer C, Tractenberg RE, Kaye J, Schafer K, Gamst A, Grundman M, Thomas R, Thal LJ. A Multicenter, Placebo-Controlled Trial of Melatonin for Sleep Disturbance in Alzheimer's Disease. *Sleep* 2003; 26: 893-901.

-Skene DJ, Swaab DF. Melatonin rhythmicity: effect of age and Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* 2003; 38: 199-206.

-Skene DJ, Vivien-Roels B, Sparks DL, Hunsaker JC, Pévet P, Ravid D, Swaab DE. Daily variation in the concentration of melatonin and 5-methoxytryptophol in the human pineal gland: effect of age and Alzheimer's disease. *Brain Research* 1990, 528: 170-174.

-Slominski A, Tobin DJ, Zmijewski MA, Wortsman J, Paus R.

Melatonin in the skin: synthesis, metabolism and functions. Trends Endocrinol Metab 2007; 19: 17-24.

-Smith MA, Rottkamp CA, Nunomura A, Raina AK, Perry G. Oxidative stress in Alzheimer's disease. Biochim Biophys Acta 2000; 1502: 139-144.

-Soto-Vega E, Meza I, Ramírez-Rodríguez G, Benítez-King G. Melatonin stimulates calmodulin phosphorylation by protein kinase C. J Pineal Res 2004; 37: 98-106.

-Soulie C, Lepagnol J, Delacourte A, Caillet-Boudin ML. Dephosphorylation studies of SKNSH-SY 5Y cell Tau proteins by endogenous phosphatase activity. Neurosci Lett 1996; 206: 189-192.

-Stamer K, Vogel R, Thies E, Mandelkow E, Mandelkow EM. Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. J Cell Biol. 2002; 156: 1051-1063.

-Steiner B, Mandelkow EM, Biernat J, Gustke N, Meyer HE, Schmidt B, Mieskes G, Soling HD, Drechsel D, Kirschner MW, Goedert M, Mandelkow E. Phosphorylation of microtubule-associated protein tau: identification of the site for Ca^{2+} -calmodulin dependent kinase and

relationship with tau phosphorylation in Alzheimer tangles. EMBO J 1990; 9: 3539-3544.

-Sutherland RJ, Rudy JW. Configural association theory: The role of the hippocampal formation in learning, memory and amnesia. Psychobiology 1989; 17: 129-144.

-Swaab DF, Fliers E, Partiman TS. The suprachiasmatic nucleus of the human brain in relation to sex, age and senile dementia. Brain Res 1985; 342: 37-44.

-Takahashi M, Tomizawa K, Ishiguro K, Takamatsu M, Fujita SC, Imahori K. Involvement of tau protein kinase I in paired helical filament-like phosphorylation of the juvenile tau in rat brain. J Neurochem 1995a; 64: 1759-1768.

-Takahashi M, Tomizawa K, Sato K, Ohtake A, Omori A. A novel tau-tubulin kinase from bovine brain. FEBS Lett 1995b; 372: 59-64.

-Thomas KB, Brown AD, Iuvone PM. Elevation of melatonin in chicken retina by 5-hydroxytryptophan: differential light/dark responses. Neuroreport. 1998; 9: 4041-4044.

-Tolman EC. Cognitive maps in rats and men. Psychol Rev.

1948; 55: 189-208.

-Tucker RP. The roles of microtubule-associated proteins in brain morphogenesis: a review. Brain Res Brain Res Rev 1990; 15: 101-120.

-Tulving E. Episodic and semantic memory. En Tulving E, Donaldson W (eds). Organization of memory. New York: Academic Press; 1972.

-Van Someren EJ, Hagebeuk EE, Lijzenga C, Scheltens P, de Rooij SE, Jonker C, Pot AM, Mirmiran M, Swaab DF. Circadian rest-activity rhythm disturbances in Alzheimer's disease. Biol Psychiatry. 1996; 40: 259-270.

-Viswanathan M, Siow YL, Paulose CS, Dakshinamurti K. Pineal indoleamine metabolism in pyridoxine-deficient rats. Brain Res 1988; 473: 37-42.

-Vitiello MV, Prinz PN, Williams DE, Frommlet MS, Ries RK. Sleep disturbances in patients with mild-stage Alzheimer's disease. J Gerontol 1990; 45: M131-138.

-Vulliet R, Halloran SM, Braun RK, Smith AJ, Lee G. Proline-directed phosphorylation of human Tau protein. J Biol Chem 1992; 267: 22570-22574.

-Walker JA, Olton DS. Fimbria-fornix lesions impair spatial working memory but not cognitive mapping. *Behav Neurosci* 1984; 98: 226-242.

-Waltz JA, Knowlton BJ, Holyoak KJ, Boone KB, Back-Madruga C, McPherson S, Masterman D, Chow T, Cummings JL, Miller BL. Relational integration and executive function in Alzheimer's disease. *Neuropsychology* 2004; 18: 296-305.

-Wang XC, Zhang J, Yu X, Han L, Zhou ZT, Zhang Y, Wang JZ. Prevention of isoproterenol-induced tau hyperphosphorylation by melatonin in the rat. *Acta Physiol Sin* 2005; 57: 7-12.

-Weissbach H, Redfield BG, Axelrod J. Biosynthesis of melatonin: enzymic conversion of serotonin to N-acetylserotonin. *Biochim Biophys Acta* 1960; 43: 352-353.

-Witting W, Kwa IH, Eikelenboom P, Mirmiran M, Swaab DF. Alterations in the circadian rest-activity rhythm in aging and Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 1990; 27: 563-572.

-Yamamoto H, Saitoh Y, Fukunaga K, Nishimura H, Miyamoto

E. Dephosphorylation of microtubule proteins by brain protein phosphatases 1 and 2A, and its effect on microtubule assembly. *J Neurochem* 1988; 50: 1614-1623.

-Zhou JN, Liu RY, Kamphorst W, Hofman MA, Swaab DF. Early neuropathological Alzheimer's changes in aged individuals are accompanied by decreased cerebrospinal fluid melatonin levels. *J Pineal Res* 2003; 35: 125-130.

-Zhu LQ, Wang SH, Ling ZQ, Wang DL, Wang JZ. Effect of inhibiting melatonin biosynthesis on spatial memory retention and tau phosphorylation in rat. *J Pineal Res* 2004; 37: 71-77.

-Zimmermann RC, McDougale CJ, Schumacher M, Olcese J, Mason JW, Heninger GR, Price LH. Effects of acute tryptophan depletion on nocturnal melatonin secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76: 1160-1164.

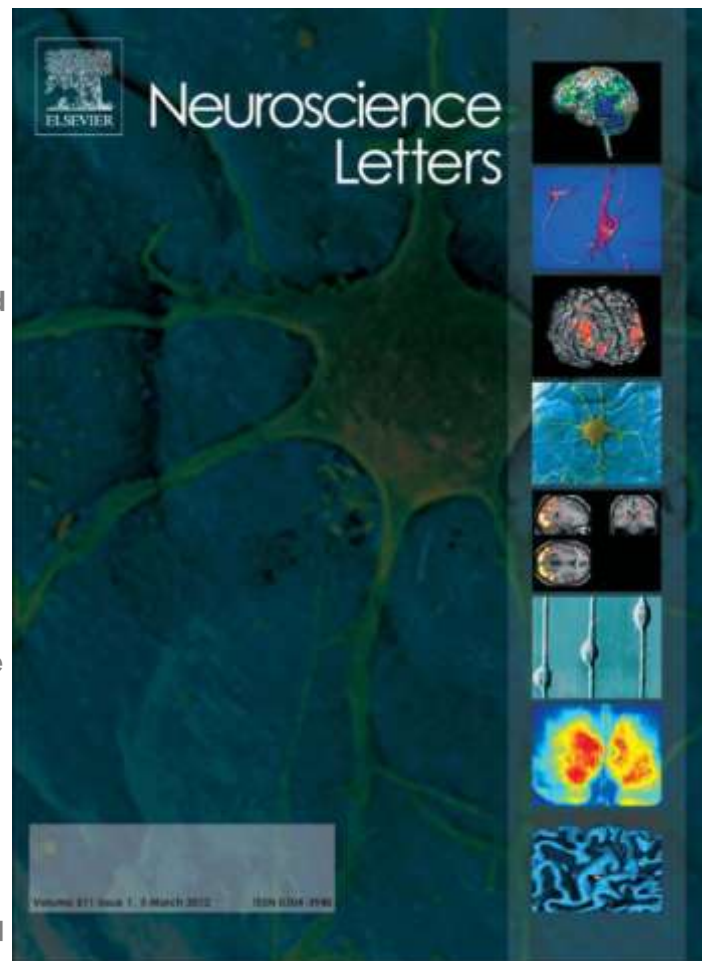
This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies,

or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>





Melatonin modulates cytoskeletal organization in the rat brain hippocampus

Graciela Jiménez-Rubio, Leonardo Ortiz-López, Gloria Benítez-King*

Departamento de Neurofarmacología, Subdirección de Investigaciones Clínicas, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, México City, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 December 2011

Received in revised form 12 January 2012

Accepted 13 January 2012

Keywords:

Melatonin

Cytoskeleton

Microtubules

Microfilaments

Photoperiod

Hippocampus

ABSTRACT

Melatonin concentration in plasma reaches high levels during the night and synchronizes body rhythms with the photoperiod. Previous evidence obtained in cultured cells suggests that melatonin synchronizes cytoskeletal re-arrangements at nocturnal plasma concentration. In this study, we determined the amount of microtubules and microfilaments in the rat hippocampus as an index of cytoskeletal organization in rats submitted to a photoperiodic regime. Additionally, these parameters were determined in control rats, sham rats, pinealectomized rats, and rats that were pinealectomized and treated with melatonin for 1 week. The results showed an increase in both the amount of microfilaments in the hippocampus of rats sacrificed in the dark phase, and in melatonin levels. In addition, a decrease in both microfilament and microtubule amounts occurred in pinealectomized rats. In contrast, melatonin treatment partially reestablished actin and tubulin proportions organized in microfilaments and microtubules, respectively. The results indicate that actin organization in microfilaments was associated with both the photoperiod and with melatonin levels. Together, the data support that cytoskeletal organization is regulated rhythmically by melatonin in synchrony with the photoperiod.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine), the main product secreted by the pineal gland, is synthesized during the night in synchrony with the photoperiod. It synchronizes different body rhythms with the photoperiod [2], and therefore, has been used as a chronobiotic in the treatment of symptoms associated with jet lag and insomnia, and in shift workers [1]. However, little is known about its synchronizing effects at cellular and molecular levels. Prior evidence obtained in the unicellular organism *Euglena gracilis* L. showed the participation of the cytoskeletal structure in cell-shape changes associated with the light–dark cycle [24]. Cytochalasin B and colchicine, which are drugs that disrupt microfilament and microtubule organization, respectively, blocked both the rhythmic cell-shape changes in the unicellular *Euglena gracilis* L., suggesting that the cytoskeletal structure is the target of synchronizer agents [24]. Moreover, cytoskeletal protein expression in plants is also cyclically regulated by the photoperiod. Guard cells of *Vicia faba* L. exhibited a diurnal cycle at alpha and beta tubulin levels [13]. In addition, in rat pineal gland, melatonin administration or

exposure to constant darkness induced an increase in microtubule content and number, respectively [12].

Cytoskeletal structure in mammalian cells is also cyclically reorganized in the presence of melatonin [32]. Incubation of kidney-derived Madin–Darby canine kidney (MDCK) cells with nanomolar concentrations of melatonin, following an administration pattern that resembles cyclic secretion and release of the indole in plasma, produces an increase in stress-fiber formation and water transport, which depends on microfilament organization. Furthermore, in N1E-115 cells, nanomolar concentrations of melatonin cause an increase in growth cone formation and in neurite enlargement, which are specialized cytoskeletal phenotypes formed by microfilament and microtubule assemblies [4].

In pathological processes such as neuropsychiatric diseases, abnormal cytoskeletal organization occurs [3,14,28,31] together with decreased levels of melatonin [21,26,27,34], sleep–wake cycle disruption [23] and diminished memory and cognition [16]. In this study, we addressed the question of whether serum melatonin levels may modulate microtubular or microfilament organization in rat hippocampus. The results showed that microfilament organization changes with the photoperiod, while no daily variation was found in microtubule organization. In addition, in pinealectomized rats, a decrease in the amount of cytoskeletal structure, measured as microtubules and microfilaments, was observed. Finally, daily administration of melatonin re-established the amount of actin organized in microfilaments. No changes were found in the amount of tubulin assembled in microtubules in pinealectomized rats administered with melatonin. The data suggest that chronic

* Corresponding author at: Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, Depto. de Neurofarmacología, SIC, Calzada México-Xochimilco #101, Col. San Lorenzo Huipulco, 14370 México, D.F., México. Tel.: +52 55 4160 5097; fax: +52 55 5513 3722.

E-mail address: bekin@imp.edu.mx (G. Benítez-King).

reduction of melatonin levels produced by pinealectomy decreases the cytoskeletal structure in rat hippocampus.

2. Materials and methods

2.1. Animals and melatonin treatment

Male Wistar rats (250 ± 20 g) were used for the experiments. Animals were maintained in a 12/12 h light/dark cycle (lights on 7:00 h, off 19:00 h) and food and water were available *ad libitum*. Another group of animals was submitted to a pinealectomy surgical procedure as described [30]. Pinealectomized rats received a daily treatment of either the vehicle or melatonin (intraperitoneal [i.p.] injection of 1 mg/kg at 10:00 h external time (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) during 1 week at 13 weeks postsurgery. Melatonin was dissolved in ethanol and diluted in saline solution (1% ethanol final concentration). Animals were sacrificed by decapitation 6 h after the last injection. Sham and pinealectomized animals were sacrificed 12 weeks after surgery at the same time of the day than rats treated with melatonin. Rats submitted to a light/dark cycle were also killed by decapitation at 14:00 and 4:00 h, respectively. In all experimental groups, the hippocampus was rapidly dissected on an ice-cold plate and cytosolic and membrane-cytoskeletal fractions were separated by centrifugation as described in Section 2.3. Samples were stored at -70°C until measurement of polymerized and depolymerized actin and tubulin. All institutional and legal regulations regarding animal ethics and handling were followed for experiments and approved by the Ethics Committee of the National Institute of Psychiatry “Ramón de la Fuente Muñiz”, México.

2.2. Determination of melatonin in serum

Serum melatonin levels were assessed by a competitive Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) [33]. Samples were handled according to the manufacturer's instructions (Commercial ELISA Kit, MP Biomedicals, Inc., Irving, CA, USA).

2.3. Separation of cytosolic and membrane-cytoskeletal fractions

Separation of cytosolic and membrane-cytoskeletal fractions was performed according to Pipeleers et al. [29] and Gillespie et al. [15]. Protein concentration was determined by the Lowry method [25] and the fractions were then stored at -70°C until analysis.

2.4. Actin determination by ELISA

Filamentous actin (F-actin) and globular actin (G-actin) were assessed by ELISA in a 10- μg aliquot of protein in either the membrane-cytoskeletal or the cytosolic fractions. Wells were covered with either of the subcellular fractions and incubated overnight at 4°C . Microplate wells were incubated with a monoclonal mouse anti-actin antibody (1:10,000; AC-40 Sigma–Aldrich) at room temperature for 2 h followed by an incubation with a secondary anti-mouse biotin antibody (1:10,000; Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, UK) at 37°C for 1 h. The reaction was detected with o-Phenylenediamine Dihydrochloride (OPD) substrate. The microplate was read at 490 nm (Benchmark, Bio-Rad). Experiments were performed in quadruplicate. Actin standard curve (0.025 – $0.2 \mu\text{g}$) from bovine muscle was simultaneously run with the same procedure.

2.5. Tubulin determination by Western blot

Microtubular or globular tubulin was separated from either membrane-cytoskeletal or cytosolic fractions, respectively (5 μg) by SDS-PAGE in 10% polyacrylamide gels [18]. Separated proteins

were transferred onto a nitrocellulose membrane for Western blot analysis. Membranes were incubated over night at 4°C with a monoclonal mouse anti-beta-tubulin primary antibody (dilution at 1:500; Invitrogen, CA, USA) followed by a horseradish peroxidase-conjugated to goat anti-mouse secondary antibody (dilution at 1:10,000; Jackson ImmunoResearch). Protein bands were developed with the Enhanced chemiluminescence (ECL) procedure (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA). Fluorogram images were acquired with a Bio-Rad GS-800 calibrated densitometer and analyzed with the Bio-Rad Quantity-1 software.

2.6. Statistical analysis

In order to normalize data, the amount of either polymerized actin or tubulin determined in the membrane-cytoskeletal fraction of pinealectomized and melatonin-treated groups of rats was divided by the amount of actin or tubulin determined in the cytosolic fraction (depolymerized) in each group. Statistical analysis was performed employing SigmaPlot 10.0 software. The data were analyzed by the unpaired Student *t*-test. Results were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) values. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results

To define whether the nocturnal serum melatonin concentration is associated with changes in cytoskeletal organization, the amount of microtubules and microfilaments in the hippocampus of rats sacrificed at 4:00 h (dark phase) and at 14:00 h (light phase) was determined, together with the amount of melatonin in serum. Fig. 1(1) depicts the melatonin concentration determined in serum obtained at both 4:00 and 14:00 h. The concentration increased by 98% in samples obtained at 4:00 h in comparison with indole levels found in serum collected at 14:00 h. Cytosolic and membrane-cytoskeletal fractions contain depolymerized and polymerized actin and tubulin, respectively. Thus, relative amounts of each protein separated in both fractions were measured and characterized by immunoblotting. Fig. 1(2) shows that nearly 50% of the tubulin was in the membrane-cytoskeletal fraction, while more than one half of the actin was found in this fraction. As illustrated in Fig. 2(1), the polymerized/depolymerized actin ratio increased 74% in darkness phase, while the polymerized/depolymerized tubulin ratio in darkness phase was not different in comparison with the ratio measured at the light phase. In addition, the microfilament amount increased by 14% in the membrane-cytoskeletal fraction in the hippocampus of rats sacrificed at 4:00 h (Fig. 2(2)), while a slight increase of 6% was observed in the microtubular amount at this fraction (Fig. 2(2)). Thus, the data suggest that cytoskeletal organization changes in synchrony with the photoperiod and are related with serum circulating melatonin levels in the dark phase.

Pinealectomy decreases plasma melatonin levels [19]. Thus, to explore cytoskeletal organization after melatonin administration, the amount of microfilaments and microtubules separated in the membrane-cytoskeletal fraction were measured in non-pinealectomized (control, sham), pinealectomized, and pinealectomized rats injected daily with the vehicle or with 1 mg/kg melatonin during 7 days, and sacrificed 6 h after the last injection. The hippocampal polymerized/depolymerized actin ratio determined in control rats was similar to that obtained in sham rats, while in pinealectomized rats, the polymerized/depolymerized actin ratio diminished by 41% (Fig. 3). In contrast, pinealectomized rats treated with melatonin showed a 298% increase in the actin polymerized/depolymerized ratio regarding the pinealectomized rats (Fig. 3). This value was similar to that obtained in intact animals sacrificed during the darkness phase (Fig. 2), while no

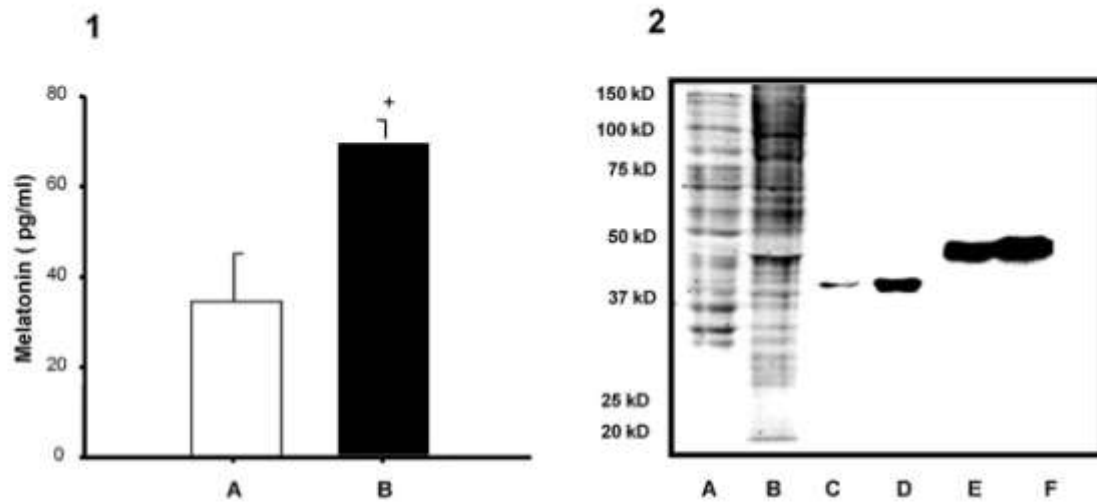


Fig. 1. Serum melatonin concentrations and hippocampal cytosolic and membrane-cytoskeletal protein characterization by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Hippocampus was dissected and cytosolic and membrane-cytoskeletal fractions were separated by differential centrifugation and by SDS-PAGE. Tubulin and actin were identified with specific antibodies by Western blot. Panel 1 shows melatonin levels determined in serum of rats sacrificed at 14:00 (A) or at 4:00 h (B), $^*p < 0.05$. Panel 2 depicts cytosolic (A, C, E) and membrane-cytoskeletal fractions (B, D, F) separated by SDS-PAGE and stained with Coomassie blue (A, B). Proteins transferred onto nitrocellulose paper were recognized with a specific anti-actin (C, D) or with anti-tubulin (E, F) antibodies and detected by (ECL).

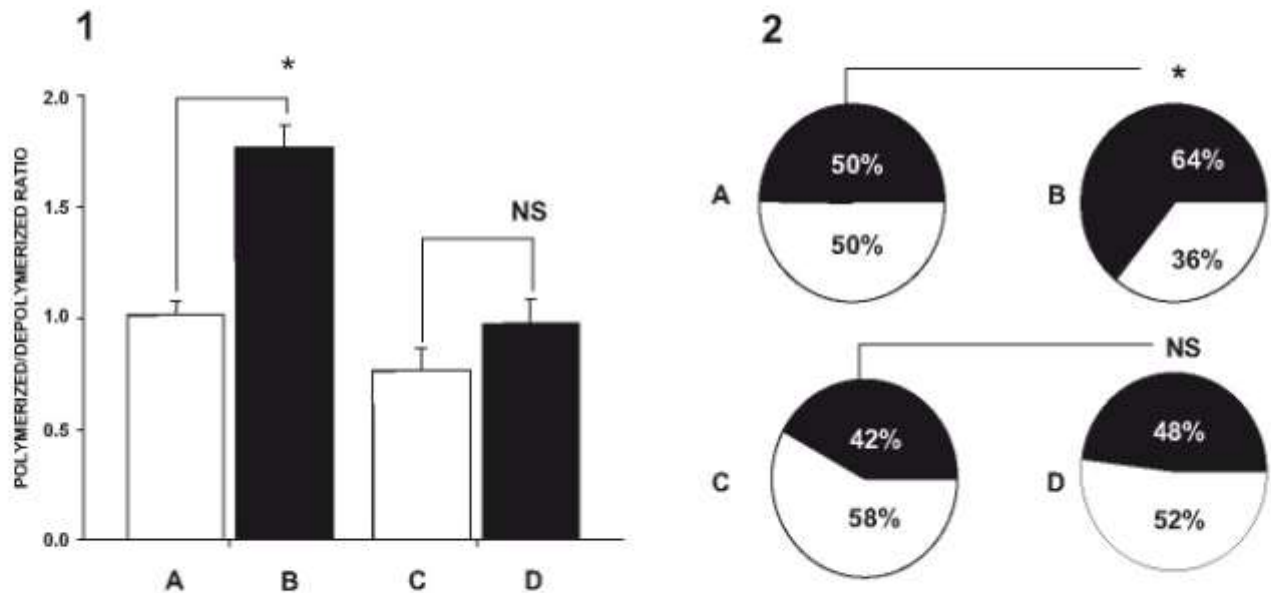


Fig. 2. Polymerized/depolymerized actin and tubulin ratios and distribution in hippocampal cytosolic and membrane-cytoskeletal fractions of rats submitted to a photoperiodic regime. Rats were maintained in 12/12 h dark/light cycles as described in Section 2. Panel 1 shows polymerized/depolymerized ratios of hippocampal actin (A, B) or tubulin (C, D) determined by Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) or by Western blot, respectively, in the membrane-cytoskeletal and cytosolic fractions obtained from rats sacrificed at 14:00 (A, C) and 4:00 h (B, D). Panel 2 shows actin (A, B) and tubulin (C, D) percentages distributed in the cytosolic (white) and membrane-cytoskeletal fractions (black) obtained from rats sacrificed during the day (A, C) or at night (B, D). $^*p < 0.001$ A vs. B.

significant differences were found between the pinealectomized group and pinealectomized animals injected with the vehicle. Similarly, tubulin polymerized/depolymerized ratios determined in sham and control (non-pinealectomized) rats were not statistically different. However, the polymerized/depolymerized tubulin ratio determined in pinealectomized rats was found to be decreased by 41% in comparison with that of control rats (Fig. 4). Pinealectomized rats treated with melatonin for 7 days showed an increase in the tubulin polymerized/depolymerized ratio, although this was not significantly different from values obtained in pinealectomized rats (Fig. 4). The data indicate that disorganization of both microfilaments and microtubules occurred in pinealectomized rats and that melatonin treatment partially re-establishes the proportion of

actin and tubulin organized in microfilaments and in microtubules, respectively.

4. Discussion

In this study, we demonstrated that the relative amount of microfilaments in the hippocampus of rats submitted to a photoperiodic regime (LO 12:12) increased during the night concomitant with melatonin levels. Moreover, in pinealectomized rats, a decrease in the quantity of cytoskeletal was observed. In contrast, daily administration of melatonin re-established the amount of actin organized in microfilaments, while no changes were found in tubulin assembled into microtubules.

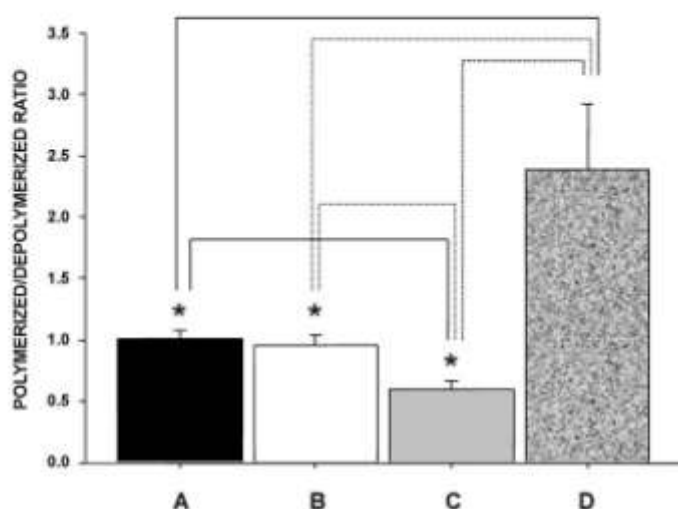


Fig. 3. Effect of melatonin on microfilament organization in pinealectomized rats. Control (A), sham (B), pinealectomized (C), or pinealectomized and treated with 1 mg/kg melatonin (D) groups of rats ($n=5$) were sacrificed and the hippocampus was dissected. Microfilament organization was estimated by measuring the amount of actin in the cytoskeletal fraction (polymerized) divided by the amount of actin determined in the cytosolic fraction (depolymerized). Asterisks indicate significant differences, $p < 0.05$.

Previous studies in cultured cells suggested that cyclic variations in melatonin levels were associated with changes in cytoskeletal phenotypes. In MDCK cells cultured for three 12/12-h cycles with melatonin followed by the vehicle, cyclic microfilament reorganization in stress fibers was observed [32]. Additionally, in neuronal cultured cells, the nocturnal plasma concentration of melatonin increased microfilament reorganization in growth cones and lamellae after 6 h of incubation [4]. Therefore, to detect variations in cytoskeletal organization, in this study, the animals were sacrificed late in the dark phase, while pinealectomized rats were sacrificed 6 h after melatonin administration. The data obtained in this study indicate that a cyclic variation in microfilament organization occurs because an increase of these cytoskeletal components in the hippocampus of rats sacrificed in the dark takes place concomitantly with increased melatonin concentration measured in serum

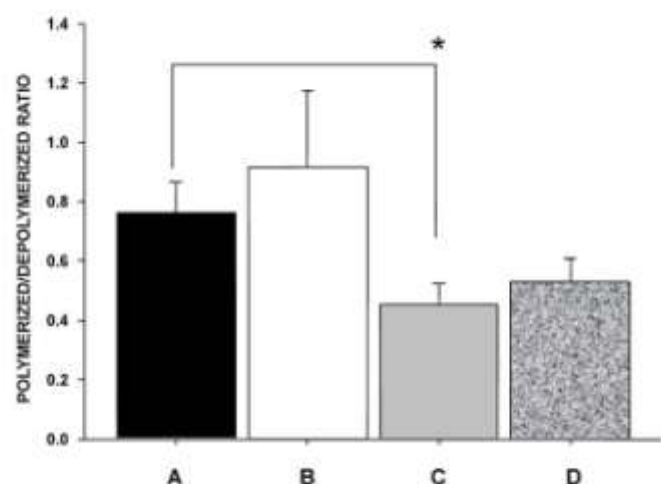


Fig. 4. Effect of melatonin on microtubule organization in pinealectomized rats. Control (A), sham (B), pinealectomized (C), or pinealectomized and treated with 1 mg/kg melatonin (D) groups of rats ($n=5$) were sacrificed and the hippocampus was dissected. Microtubule organization was estimated by measuring the amount of tubulin in the cytoskeletal fraction (polymerized) divided by the amount of tubulin determined in the cytosolic fraction (depolymerized). Asterisks indicate significant differences regarding the control group with $p < 0.05$.

during the night. In addition, this conclusion is supported by the fact that administration of melatonin to pinealectomized rats causes a robust increase in microfilament content in the hippocampus, probably due to an upregulation of melatonin receptors that follows suppression of the indole production by pinealectomy [11]. Thus, taking the evidences obtained in this work together supports that microfilament organization is modulated with the photoperiod by melatonin signaling.

Nocturnal plasma melatonin concentration increased microtubule polymerization and neurite formation in N1E-115 cells [4,17]. In this study, we found that chronic pinealectomy-induced melatonin deprivation caused a decrease in the amount of microtubules, which were partially re-established by melatonin. Also, a slight, although not significant, increase was observed in the amount of microtubules of rats sacrificed under conditions of darkness. These evidences, in addition to the fact that pinealectomy causes a microtubular collapse concomitant with loss of pyramidal cells in both CA1 and CA3 regions of the hippocampus [5,10], support that melatonin synchronizes microtubule organization with the photoperiod.

Microfilaments are constitutively assembled and arranged to form specific phenotypes that participate in several cell processes such as movement and growth cone guidance, among others [22]. On the other hand, there are two types of microtubules: one with rapid turnover, and a second, stabler and with low turnover. In neuronal cells, this population is axon-enriched to maintain the cells' structure and the long neuronal processes [8]. Therefore, the fact that in this work we find a slight increase in microtubule content after melatonin administration suggests that rapid turnover of the microtubule population is the target for melatonin, which stimulates tubulin polymerization as previously reported, while abundant stable microtubules present in the hippocampus are not affected.

Cytoskeletal organization plays a key role in axonal transport, neurotransmitter release, and receptor positioning. Therefore, we suggest that diminished melatonin levels caused by pinealectomy or related with neuropsychiatric disease etiology [21,26,27,34] participate in cytoskeletal alterations which lead to functional deficiencies. In this regard, recently spatial memory deficits in rats were demonstrated as produced by pinealectomy and re-established by melatonin treatment [20,36]. Moreover, in patients with Alzheimer disease with diminished melatonin levels and cognitive dysfunctions, melatonin administration delayed the progression of cognitive and behavioral disease signs [7]. In addition, postmortem studies of the brain from patients with neuropsychiatric diseases indicate a decrease in dendritic length and in the number of dendritic spines [6,9,35]. Thus, evidences suggest that in neuropsychiatric diseases, an association exists between a chronic decrease in melatonin levels and cytoskeletal alterations. Therefore, evidence obtained in this study suggests the use of melatonin in the treatment of neuropsychiatric diseases to re-establish cytoskeletal alterations and as drug to prevent dementia.

Acknowledgment

This work was supported by the National Council of Science and Technology (CONACYT-Mexico) grant SEP-Conacyt No. 46593-M.

References

- [1] J. Arendt, D.J. Skene, B. Middleton, S.W. Lockley, S. Deacon, Efficacy of melatonin treatment in jet lag, shift work, and blindness, *J. Biol. Rhythms* 12 (1997) 604–617.
- [2] S.M. Armstrong, Melatonin and circadian control in mammals, *Experientia* 45 (1989) 932–938.
- [3] S.E. Arnold, V.M. Lee, R.E. Gur, J.Q. Trojanowski, Abnormal expression of two microtubule-associated proteins (MAP2 and MAP5) in specific subfields of the

- hippocampal formation in schizophrenia, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88 (1991) 10850–10854.
- [4] A. Belkón, L. Ortiz-López, G. Ramírez-Rodríguez, F. Antón-Tay, G. Benítez-King, Melatonin induces neuritogenesis at early stages in N1E-115 cells through actin rearrangements via activation of protein kinase C and Rho-associated kinase, *J. Pineal Res.* 42 (2007) 214–221.
 - [5] L.S. Brewton, L. Haddad, E.C. Azmitia, Colchicine-induced cytoskeletal collapse and apoptosis in N-18 neuroblastoma cultures is rapidly reversed by applied 5-100 beta, *Brain Res.* 912 (2001) 9–16.
 - [6] K. Broadbelt, W. Byne, L.B. Jones, Evidence for a decrease in basilar dendrites of pyramidal cells in schizophrenic medial prefrontal cortex, *Schizophr. Res.* 58 (2002) 75–81.
 - [7] L.I. Brusco, M. Márquez, D.P. Cardinali, Melatonin treatment stabilizes chronobiologic and cognitive symptoms in Alzheimer's disease, *Neuroendocrinol. Lett.* 21 (2000) 39–42.
 - [8] M.A. Cambray-Deakin, R.D. Burgoyne, Posttranslational modifications of α -tubulin: acetylated and dephosphorylated forms in axons of rat cerebellum, *J. Cell Biol.* 104 (1987) 1569–1574.
 - [9] G. Chana, S. Landau, C. Beasley, I.P. Everall, D. Cotter, Two-dimensional assessment of cytoarchitecture in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder, bipolar disorder, and schizophrenia: evidence for decreased neuronal somal size and increased neuronal density, *Biol. Psychiatry* 53 (2003) 1086–1098.
 - [10] M. De Butte, B.A. Pappas, Pinealectomy causes hippocampal CA1 and CA3 cell loss: reversal by melatonin supplementation, *Neurobiol. Aging* 28 (2007) 306–313.
 - [11] M.M. De Reuvers, Y. Tillet, J. Pelletier, Melatonin binding sites in the brain of sheep exposed to light or pinealectomized, *Neurosci. Lett.* 121 (1991) 17–20.
 - [12] F. Freire, D.P. Cardinali, Effects of melatonin treatment and environmental lighting on the ultrastructural appearance, melatonin synthesis, norepinephrine turnover and microtubule protein content of the rat pineal gland, *J. Neural Transm.* 37 (1975) 237–257.
 - [13] M. Fukuda, S. Hasegawa, N. Nakajima, N. Kondo, Changes in tubulin protein expression in guard cells of *Vicia faba* L. accompanied with dynamic organization of microtubules during the diurnal cycle, *Plant Cell Physiol.* 41 (2000) 600–607.
 - [14] L.J. Garey, W.Y. Ong, T.S. Patel, M. Kanani, A. Davis, A.M. Mortimer, T.R. Barnes, S.R. Hirsch, Reduced dendritic spine density on cerebral cortical pyramidal neurons in schizophrenia, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 65 (1998) 446–453.
 - [15] C.S. Gillespie, R. Wilson, A. Davidson, P.J. Brophy, Characterization of a cytoskeletal matrix associated with myelin from rat brain, *Biochem. J.* 260 (1989) 689–696.
 - [16] C.L. Grady, M.L. Furey, P. Pietrini, B. Horwitz, S.I. Rapoport, Altered brain functional connectivity and impaired short-term memory in Alzheimer's disease, *Brain* 124 (2001) 739–756.
 - [17] L. Huerto-Delgadillo, F. Antón-Tay, G. Benítez-King, Effects of melatonin on microtubule assembly depend on hormone concentration: role of melatonin as a calmodulin antagonist, *J. Pineal Res.* 17 (1994) 55–62.
 - [18] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
 - [19] A.J. Lewy, M. Tetsuo, S.P. Markey, F.K. Goodwin, I.J. Kopin, Pinealectomy abolishes plasma melatonin in the rat, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 50 (1980) 204–205.
 - [20] Z.-Q. Ling, Q. Tiana, L. Wang, Z.-Q. Fua, X.-C. Wang, Q. Wang, J.-Z. Wang, Constant illumination induces Alzheimer-like damages with endoplasmic reticulum involvement and the protection of melatonin, *J. Alzheimers Dis.* 16 (2009) 287–300.
 - [21] R.-Y. Liu, J.-N. Zhou, J.V. Heerikhuijsen, M.A. Hofman, D.F. Swaab, Decreased melatonin levels in postmortem cerebrospinal fluid in relation to aging, Alzheimer's disease, and Apolipoprotein E- ϵ 4 genotype, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84 (1999) 323–327.
 - [22] H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaira, J. Darnell, *Molecular Cell Biology*, third ed., Scientific American Books, New York, 1995.
 - [23] R.J. Loewenstein, H. Weingartner, J.C. Gillin, W. Kaye, M. Ebert, W.B. Mendelson, Disturbances of sleep and cognitive functioning in patients with dementia, *Neurobiol. Aging* 3 (1982) 371–377.
 - [24] T.A. Loneragan, Regulation of cell shape in *Euglena gracilis*. I. Involvement of the biological clock, respiration, photosynthesis, and cytoskeleton, *Plant Physiol.* 71 (1983) 719–730.
 - [25] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
 - [26] N.P.V. Nair, N. Hariharasubramanian, C. Pilapil, Circadian rhythm of plasma melatonin in endogenous depression, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 6 (1984) 715–716.
 - [27] J.I. Nurnberger, S. Adkins, D.K. Lahiri, A. Mayeda, K. Hu, A. Lewy, A. Miller, E.S. Bowman, M.J. Miller, L. Rau, C. Smiley, D. Davis-Singh, Melatonin suppression by light in euthymic bipolar and unipolar patients, *Arch. Gen. Psychiatry* 57 (2000) 572–579.
 - [28] G. Perry, R. Friedman, D.H. Kang, V. Manetto, L. Autilio-Gambetti, P. Gambetti, Antibodies to the neuronal cytoskeleton are elicited by Alzheimer paired helical filament fractions, *Brain Res.* 420 (1987) 233–242.
 - [29] D.G. Pipeleers, M.A. Pipeleers-Marichal, P. Sherline, D.M. Kipnis, A sensitive method for measuring polymerized and depolymerized forms of tubulin in tissues, *J. Cell Biol.* 74 (1977) 341–350.
 - [30] G. Pohlmeier, S. Reuss, A. Baum, An improved technique for visually controlled pinealectomy in the rat, *J. Exp. Anim. Sci.* 36 (1994) 84–88.
 - [31] G. Rajkowska, J.J. Miguel-Hidalgo, J. Wei, G. Dille, S.D. Pittman, H.Y. Meltzer, J.C. Overholser, B.L. Roth, C.A. Stockmeier, Morphometric evidence for neuronal and glial prefrontal cell pathology in major depression, *Biol. Psychiatry* 45 (1999) 1085–1098.
 - [32] G. Ramírez-Rodríguez, I. Meza, M.E. Hernández, A. Castillo, G. Benítez-King, Melatonin induced cyclic modulation of vectorial water transport in kidney-derived MDCK cells, *Kidney Int.* 63 (2003) 1356–1364.
 - [33] R.J. Reiter, Functional diversity of the pineal hormone melatonin: its role as an antioxidant, *Exp. Clin. Endocrinol.* 104 (1996) 10–16.
 - [34] S. Robinson, P. Rosca, R. Durst, U. Shai, C. Guinea, U. Schmidt, I. Nir, Serum melatonin levels in schizophrenic and schizoaffective hospitalized patients, *Acta Psychiatr. Scand.* 84 (1991) 221–224.
 - [35] G. Rosoklija, C. Toomayan, S.P. Ellis, J. Keilp, J.J. Mann, N. Latov, A.P. Hays, A.J. Dwork, Structural abnormalities of subicular dendrites in subjects with schizophrenia and mood disorders, *Arch. Gen. Psychiatry* 57 (2000) 349–356.
 - [36] L.Q. Zhu, S.H. Wang, Z.Q. Ling, D.L. Wang, J.-Z. Wang, Effect of inhibiting melatonin biosynthesis on spatial memory retention and tau phosphorylation in rat, *J. Pineal Res.* 37 (2004) 71–77.

